



# Le contrôle de la traduction des ARN par la protéine NSP3 de rotavirus à l'épreuve d'un essai de traduction in vivo

Matthieu Gratia

## ► To cite this version:

Matthieu Gratia. Le contrôle de la traduction des ARN par la protéine NSP3 de rotavirus à l'épreuve d'un essai de traduction in vivo. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA114825 . tel-01208144

**HAL Id: tel-01208144**

**<https://theses.hal.science/tel-01208144>**

Submitted on 2 Oct 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## UNIVERSITÉ PARIS-SUD

**ÉCOLE DOCTORALE : Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué**  
**Au laboratoire de Virologie Moléculaire et Structurale**

**DISCIPLINE : Pôle microbiologie**

## THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 29/09/2014

par **Matthieu GRATIA**

Le contrôle de la traduction des ARN par la protéine  
NSP3 de rotavirus à l'épreuve d'un essai de traduction  
*in vivo*.

**Directeur de thèse :**

Didier PONCET

DR2 (CNRS, INRA)

**Composition du jury :**

*Rapporteurs :*

Théophile OHLMANN  
Antoine GARBARG-CHENON  
Stéphane Pyronnet  
Audrey Esclatine

DR2 (INSERM)  
PU-PH (Groupe Hospitalier HUEP)  
DR2 (INSERM)  
MCU (Université Paris-Sud)

*Examineurs :*

## *Un grand Merci...*

Je tiens d'abord à remercier Didier Poncet de m'avoir accueilli au sein de son équipe durant ces quatre années. Un grand merci pour m'avoir soutenu et avoir tout mis en oeuvre pour que je puisse travailler dans les meilleures conditions.

Je remercie le Dr. Théophile Ohlmann de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon, et le Pr. Antoine Garbarg-Chenon de la Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie d'avoir accepté d'être mes rapporteurs au sein de mon jury. De même, je remercie le Dr. Stéphane Pyronnet de l'Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil ainsi que le Dr. Audrey Esclatine de la faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry d'avoir accepté d'être examinateurs au sein de mon jury.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement chacun des « Rotas », tant pour leurs soutiens et expertises vis-à-vis de mon travail que pour les bons moments passés ensemble : que ce soit Didier ou les autres membres, vous représentez une équipe agréable à vivre et à y travailler.

Aussi, je remercie Patrice Vende, pour sa bonne humeur et son humour omniprésent, mais aussi Cécile Laroche, Annie Charpilienne et Mariela Duarte ; toujours présentes pour participer à cette bonne ambiance dans laquelle j'ai baigné pendant ces quelques années. Je tiens à nouveau à les remercier pour leurs soutiens et de m'avoir fait partager leurs expériences pour m'aider durant mon travail. Je remercie particulièrement Annie, qui a dû se cogner la correction de la déplorable orthographe de mon mémoire. Enfin, je tiens aussi à remercier les anciens membres de l'équipe ; Davy Martin et Matthieu Saguy ; qui nous sont partis vers d'autres horizons mais avec qui j'aurai passé aussi de bons moments.

Je tiens aussi à remercier les membres de l'équipe « Microscopie » ; Jean Lepault, Malika Ouldali et Agnès Delacroix Delavalette Bohem mais aussi les membres de l'équipe « Archae » arrivées récemment ; Marie-Claude Serre et Julie Neveu ; avec qui une certaine complicité existe et permet cette cohésion à notre étage.

De manière plus générale, je remercie l'ensemble des membres du laboratoire et son directeur, Yves Gaudin, pour leurs accueils et leurs soutiens m'ayant permis d'accomplir dans les meilleures conditions mon travail de thèse.

Je tiens particulièrement à remercier Cyntia Taveneau d'avoir été présente pour me changer les esprits, notamment dans ces trop longs mois de rédaction. Un bon courage à toi et aux autres doctorant(e)s qui vont suivre après moi.

Enfin, je tiens évidemment à remercier ma famille pour leurs soutiens, et j'ai une petite pensée pour mon frangin et mon cousin qui se sont engagés à leur tour dans une thèse. Un grand merci à mes potes qui m'ont aussi permis de me libérer l'esprit quand c'était nécessaire et qui sans eux, la vie serait bien morne !

Je conclurai et n'ajouterai pas d'autres mots superflus exceptés...

***Un grand Merci à tous !***



## *Liste des abréviations*

**ABCE1** : ATP-Binding Cassette Sub-Family E 1  
**Ago** : Protéine Argonaute composant le complexe miRISC  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**ARN « Bulg »** : ARN rapporteur comportant les séquences reconnues partiellement d'un miRNA  
**ARNdb** : ARN double brin  
**ARNi** : ARN interférent  
**ARNm** : ARN messenger  
**ARN « Mut »** : ARN rapporteur comportant des séquences mutées non reconnues par les miRNA  
**ARN Nona** : ARN rapporteur ne se finissant pas par l'extrémité 3' GACC des rotavirus  
**ARN poly(A) ou pA** : ARN rapporteur se finissant par une extrémité polyadénylée  
**ARN « Perf »** : ARN rapporteur comportant une séquence reconnue parfaitement par les miRNA  
**ARNr** : ARN ribosomique  
**ARN Rota** : ARN se finissant par l'extrémité 3' GACC des rotavirus  
**ARNsb** : ARN simple brin  
**ARNt** : ARN de transfert  
**ARNti Met** : ARN de transfert initiateur Méthionine  
**ATP** : Adénosine triphosphate  
**BSR-T7** : Cellules BSR exprimant constitutivement la polymérase T7  
**Cluc** : Luciférase Cypridina  
**Ct** : Cycle threshold ou cycle seuil en qRT-PCR  
**C20bis** : Lignée de cellules issue de MA104 exprimant constitutivement NSP3 de souche RF  
**DLP** : Double layered particle  
**eEF** : eucaryotic Elongation Factor  
**eGFP** : enhanced Green Fluorescent Protein  
**eIF** : eucaryotic Initiation Factor  
**EMCV** : Encephalomyocarditis virus  
**eRF** : eucaryotic Release Factor  
**Fluc** : Luciférase Firefly  
**GAP** : GTPase-Activating Protein  
**GAPDH** : glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase  
**GCN2** : General control Nonderepressible 2  
**GDI** : GDP Dissociation Inhibitor  
**GDP** : Guanosine diphosphate  
**GTP** : Guanosine triphosphate  
**GW182** : Facteur impliqué dans la régulation par les miRNA et riche en glycines et tryptophanes  
**hpi** : heure post-infection  
**HRI** : Heme-regulated eIF2 $\alpha$  kinase  
**IRES** : Internal Ribosomal Entry Site  
**ITAF** : IRES Trans-Activating Factor  
**kb** : kilobase  
**Kd** : Constante de dissociation  
**kDA** : kiloDalton  
**MA104** : Cellules de reins de singes verts (*Macaca mulatta*)  
**miRISC** : miRNA-mediated silencing complex  
**miRNA** : microRNA  
**Mnk** : MAPK-activated protein kinase

**MOI** : Multiplicity of infection  
**mRNP** : messenger ribonucleoprotein particle  
**mTOR** : mammalian Target of Rapamycin  
**NES** : Nuclear Export Signal  
**NLS** : Nuclear Localization Signal  
**NSP** : Non-Structural Protein  
**NSP3 wt** : NSP3 sauvage  
**NSP3 d4G** : Mutant de délétion du domaine de liaison à eIF4G de NSP3  
**NSP3 mutRBD** : Mutant ponctuel dans le domaine de liaison à l'ARN de NSP3  
**nt** : nucléotide  
**ORF** : Open Reading Frame  
**PABP** : Poly(A) Binding Protein  
**PAIP** : Poly(A)-binding protein-Interacting Protein  
**pb** : paire de bases  
**p-bodies** : processing bodies  
**PERK** : protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase  
**Pi** : Phosphate libéré suite à une hydrolyse  
**PIC ou 43S** : complexe de préinitiation  
**PKR** : Protéin Kinase R  
**qRT-PCR** : quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction  
**RE** : Réticulum endoplasmique  
**RF** : Rotavirus Français (Souche bovine)  
**Rluc** : Luciférase Renilla  
**RoXaN** : Rotavirus 'X'-associated non-structural protein  
**RRM** : RNA Recognition Motif  
**RRV** : Rhesus Rotavirus (Souche simienne)  
**SA11** : Souche simienne de rotavirus  
**SG** : Granules de stress  
**SLP (ou core)** : Single layered particle  
**TC** : Complexe ternaire  
**TLP** : Triple layered particle  
**ts** : thermosensible  
**tsH** : Mutant thermosensible H  
**tsI** : Mutant thermosensible I  
**T2A** : Séquence 2A issue du virus Thosea asigna  
**UTR** : Untranslated Region  
**UV** : Ultraviolet  
**VLP** : Virus-like particle  
**VP** : Viral protein  
**VPg** : Viral Protein genome-linked  
**wt** : sauvage  
**4E-BP** : eIF4E Binding Protein  
**40S** : Sous-unité 40S du ribosome  
**48S** : Complexe 48S composé de l'ARNm, d'eIF4F et du PIC  
**60S** : Sous-unité 60S du ribosome  
**80S** : Ribosome complet composé de ses sous-unités 40S et 60S

# Sommaire

<b>Chapitre 1 : Introduction</b>	<b>1</b>
<b>Partie I : La traduction</b>	<b>1</b>
<b>I/ Généralités</b>	<b>1</b>
<b>II/ Voie canonique de la traduction</b>	<b>2</b>
<b>A/ L'initiation de la traduction</b>	<b>3</b>
1/ Assemblage du complexe de préinitiation (43s PIC)	3
a/ Le complexe ternaire	3
b/ Le facteur eIF3	4
c/ Le facteur eIF5	4
d/ Le facteur eIF1	4
e/ Le facteur eIF1A	5
2/ Assemblage du complexe eIF4F et recrutement du complexe de préinitiation au niveau de l'ARNm	5
a/ Le facteur eIF4E	6
b/ Le facteur eIF4A	8
c/ Les facteurs eIF4B et eIF4H	10
d/ Le facteur PABP ; « Poly(A) Binding Protein »	11
e/ Le facteur eIF4G	11
f/ Modèle de circularisation de l'ARNm et synergie	14
3/ Etape de « balayage » de l'ARN par le PIC : reconnaissance du codon d'initiation	14
a/ « Balayage » et régions non traduites	14
b/ Contexte et reconnaissance de l'AUG	20
<b>B/ Recrutement de la sous-unité 60S et élongation</b>	<b>21</b>
<b>C/ Terminaison de la traduction et recyclage des ribosomes</b>	<b>24</b>
<b>III/ Voies de régulation de la traduction</b>	<b>28</b>
<b>A/ mTOR : facteur de régulation de l'initiation de la traduction</b>	<b>28</b>
1/ eIF4E et 4E-BP : un mécanisme de régulation des ARNm coiffés	31
2/ eIF4A et eIF4B : régulation de la traduction des ARNm structurés	31
<b>B/ La sous-unité eIF2<math>\alpha</math> : une autre voie majeure de régulation</b>	<b>32</b>
<b>IV/ La traduction virale : voies d'initiation de la traduction non conventionnelles</b>	<b>34</b>
<b>A/ Ciblage du complexe eIF4F</b>	<b>34</b>
1/ Coiffe et eIF4E	34
a/ Décoiffage / vol de coiffe	35
b/ Ciblage du facteur eIF4E	36
c/ Stratégie d'inactivation de la traduction dépendante du facteur eIF4E	37
d/ Stratégies d'activation du facteur eIF4E	38
2/ Ciblage d'eIF4G	39
3/ Ciblage de la PolyA Binding Protein (PABP)	40
4/ Cas particuliers non évoqués	41
<b>B/ Ciblage du complexe 43S</b>	<b>41</b>
1/ Ciblage de l'eIF3	41
2/ Ciblage de l'eIF2	44
a/ Blocage des voies de régulation par les kinases	45

<i>b/ Stratégies alternatives contre l'activation de la PKR : empêcher l'interaction entre les ARNdb et la kinase</i> .....	45
<i>c/ Activation par séquestration des ARN double brins</i> .....	46
<i>d/ Ciblage de la sous-unité eIF2<math>\alpha</math></i> .....	46
<i>e/ Voie de traduction indépendante du facteur eIF2</i> .....	46
<b>C/ Recrutement des facteurs d'initiations via des structures secondaires d'ARNm ....</b>	<b>47</b>
1/ Les IRES de type I .....	50
2/ Les IRES de type II .....	50
3/ Les IRES de type III .....	50
4/ Les IRES de type IV .....	51
<b>Partie II : Rotavirus .....</b>	<b>53</b>
<b>I/ Introduction .....</b>	<b>53</b>
<b>A/ Importance du rotavirus en santé humaine et animale.....</b>	<b>53</b>
<b>B/ Description de la particule .....</b>	<b>54</b>
<b>C/ Le génome viral .....</b>	<b>57</b>
1/ Variabilité des rotavirus .....	58
<i>a/ Réassortiment</i> .....	58
<i>b/ Réarrangement</i> .....	59
<i>c/ Mutations ponctuelles</i> .....	60
2/ Les protéines virales .....	60
<i>a/ La polymérase VP1</i> .....	60
<i>b/ La protéine du core VP2</i> .....	61
<i>c/ La protéine VP3</i> .....	62
<i>d/ La protéine de capsid externe VP4</i> .....	62
<i>e/ La protéine de capsid intermédiaire VP6</i> .....	64
<i>f/ La protéine de capsid externe VP7</i> .....	65
<i>g/ La protéine NSP1</i> .....	66
<i>h/ La protéine NSP2</i> .....	67
<i>i/ La protéine NSP3</i> .....	69
<i>j/ La protéine NSP4</i> .....	69
<i>k/ La protéine NSP5</i> .....	69
<i>l/ La protéine NSP6</i> .....	71
<b>D/ Cycle réplcatif.....</b>	<b>71</b>
1/ Entrée et décapsidation .....	72
2/ Transcription et traduction .....	73
3/ Réplication et assemblage viral .....	73
4/ Acquisition de la couche externe et sortie du virus .....	75
<b>II/ La protéine NSP3 du rotavirus.....</b>	<b>77</b>
<b>A/ Généralités .....</b>	<b>77</b>
<b>B/ NSP3 : premières évidences de l'implication de NSP3 dans la traduction .....</b>	<b>78</b>
1/ Caractérisation des domaines fonctionnels de NSP3.....	78
2/ Implication de NSP3 dans la traduction virale.....	79
3/ Structures de NSP3.....	80
4/ Un cofacteur cellulaire de NSP3 : RoXaN .....	83
<i>a/ Identification et caractérisation du facteur</i> .....	83
<i>b/ Relocalisation nucléaire de la PABP au cours de l'infection par le rotavirus.....</i>	84
<b>C/ Remise en cause de l'implication de NSP3 dans la traduction .....</b>	<b>85</b>

1/ « NSP3 n'est pas utile à la traduction virale » ; Expérience de siRNA contre le gène 7 .....	85
2/ Virus réarrangé sur le gène 7 .....	87
3/ NSP3 et l'inhibition de l'export des ARNm cellulaires .....	88
<b>D/ Autres propriétés associées à la protéine NSP3.....</b>	<b>90</b>
1/ NSP3 et virulence .....	90
2/ NSP3, eIF2 et réponse UPR .....	91
Interaction entre Hsp90 et NSP3 .....	91
3/ Mutations thermosensibles de NSP3 .....	91
 <b>III/ But du travail : quantification de l'effet de NSP3 sur la traduction des ARN de rotavirus .....</b>	 <b>93</b>
 <b>Chapitre 2 : Matériels et méthodes.....</b>	 <b>94</b>
<b>I/ Constructions plasmidiques .....</b>	<b>94</b>
<b>A/ Préparations d'ADN plasmidiques .....</b>	<b>94</b>
1/ Mini préparations .....	94
2/ Midi préparations .....	94
<b>B/ Digestion enzymatique et analyse en gel d'agarose .....</b>	<b>94</b>
<b>C/ Purification sur gel .....</b>	<b>95</b>
<b>D/ Ligation et transformation .....</b>	<b>95</b>
<b>E/ Mutagenèse dirigée .....</b>	<b>95</b>
<b>F/ Constructions des plasmides « rapporteurs », « standard » et « d'expression de NSP3 » .....</b>	<b>96</b>
1/ Plasmides utilisés pour la transcription des ARN utilisés comme rapporteurs.....	96
a/ Mutagenèse de l'extrémité 3' .....	97
b/ Echange des 5' et 3' UTR .....	97
c/ Polyadénylation des ARN rapporteurs .....	98
2/ Plasmides utilisés pour la transcription des ARN utilisés comme standards de transfection. ....	98
3/ Plasmides utilisés pour l'expression de NSP3 wt et mutées .....	99
 <b>II/ Synthèse d'ARN <i>in vitro</i> .....</b>	 <b>100</b>
<b>A/ Préparation et purification des matrices .....</b>	<b>100</b>
<b>B/ Transcription, purification et quantification des ARN .....</b>	<b>100</b>
 <b>III/ Culture de cellules .....</b>	 <b>101</b>
<b>A/ Transfection .....</b>	<b>102</b>
1/ Lipofection d'ADN ou d'ARN : .....	102
2/ Electroporation d'ARN .....	102
3/ Infection par le rotavirus : .....	103
 <b>IV/ Transcription inverse et PCR quantitative .....</b>	 <b>103</b>
<b>A/ Récupération et stockage des cellules .....</b>	<b>103</b>
<b>B/ Extractions et concentrations des ARN totaux.....</b>	<b>104</b>
<b>C/ Transcription inverse aléatoire (RT) à partir des ARN totaux : .....</b>	<b>104</b>
<b>D/ PCR quantitative : .....</b>	<b>104</b>
 <b>V/ Immunodétection (Western blot (WB)).....</b>	 <b>105</b>

1/ Détection par chemiluminescence : .....	106
2/ Détection par fluorescence: .....	106

<b>VI/ Mesure des activités luciférase</b> .....	<b>107</b>
--	------------

<b>Chapitre 3 : Résultats</b> .....	<b>108</b>
-------------------------------------	------------

<b>I/ Rôle de la protéine NSP3 sur la traduction d'ARN de type rotavirus</b> .....	<b>108</b>
--	------------

<b>A/ Effet de l'infection par le rotavirus sur la stabilité des ARN de type rotavirus, non rotavirus ou polyadénylé</b> .....	<b>108</b>
--	------------

1/ Méthodologie .....	108
-----------------------	-----

2/ Impact de l'infection par le rotavirus sur la traduction des ARNm polyadénylés .....	109
---	-----

a/ Effet de l'infection sur la stabilité des ARN rapporteurs .....	109
--	-----

b/ Effet de l'infection sur la traduction des ARN rapporteurs .....	111
---	-----

3/ Application à une lignée de MA104 exprimant NSP3 .....	112
---	-----

a/ Effet de l'expression de NSP3 sur la stabilité des ARN rapporteurs .....	112
---	-----

b/ Effet de l'expression de NSP3 sur la traduction des ARN rapporteurs .....	114
--	-----

<b>B/ Effet de chaque domaine de NSP3 sur la traduction d'un ARN rapporteur de type rotavirus</b> .....	<b>114</b>
---	------------

1/ Mise au point du système .....	114
-----------------------------------	-----

a/ Expression de NSP3 .....	114
-----------------------------	-----

b/ Cinétique d'expression de la luciférase .....	115
--	-----

c/ Standardisation des transfections .....	116
--	-----

d/ Effet de la présence d'une coiffe sur les ARN rapporteurs et standardisation des transfections .....	118
---	-----

e/ Effet d'une quantité variable de NSP3 sur la traduction d'un ARN rapporteur .....	118
--	-----

2/ Application du système : étude de l'effet des domaines de NSP3 .....	120
---	-----

<b>C/ Mesure de l'effet « cis » de NSP3 sur la traduction d'un ARN rapporteur de type rotavirus</b> .....	<b>122</b>
---	------------

1/ Cotransfection d'ARN .....	122
-------------------------------	-----

2/ Le système « T2A » : preuve du concept .....	124
---	-----

3/ Application du système « T2A » .....	125
---	-----

a/ Vérification de la dépendance à la coiffe de la traduction du gène codant NSP3 .....	125
---	-----

b/ Rôle de la protéine NSP3 dans la traduction de son propre ARNm .....	128
---	-----

c/ Effet de NSP3 sur la stabilité des ARN de type rotavirus .....	130
---	-----

<b>D/ Application du système T2A aux mutants thermosensibles de NSP3</b> .....	<b>132</b>
--	------------

<b>II/ Etude des caractéristiques des ARNm de rotavirus susceptibles d'influencer leur traduction</b> .....	<b>133</b>
---	------------

<b>A/ Etude sur l'extrémité 3' des gènes de rotavirus reconnue par NSP3</b> .....	<b>134</b>
---	------------

1/ Effet des extrémités GACC, GGCC ou GAACC sur la traduction des ARN « Rota » en présence de NSP3 des souches RF, RRV ou SA11 .....	134
--	-----

2/ Effet d'une extrémité 3' non reconnue par NSP3 sur la traduction de l'ARN .....	136
--	-----

<b>B/ Etude des régions non traduites (UTR) du gène 4 de rotavirus</b> .....	<b>137</b>
--	------------

1/ Effet du 5' UTR sur la traduction d'ARN Rota ou poly(A) .....	137
--	-----

2/ Effet du 3' UTR sur la traduction d'ARN Rota .....	141
---	-----

a/ Substitution du 3' UTR de gène 6 par la 3' UTR de gène 4 .....	141
---	-----

b/ Effet du 3' UTR sur la traduction dépendante de NSP3 .....	142
---	-----

c/ Prédiction de structure des ARN rapporteurs .....	144
--	-----

<b>Chapitre 4 : Discussion.....</b>	<b>147</b>
<b>I/ Effet de NSP3 sur la stabilité des ARN transfectés pendant ou hors infection .....</b>	<b>147</b>
<b>A/ Electroporation d'ARN rapporteurs Rota dans des cellules infectées ou non par le rotavirus. ....</b>	<b>147</b>
<b>B/ Electroporation d'ARN rapporteurs Rota dans des cellules exprimant NSP3 de façon transitoire .....</b>	<b>148</b>
<b>C/ Electroporation d'ARN rapporteurs Rota dans des cellules exprimant NSP3 de façon transitoire .....</b>	<b>148</b>
<b>II/ Effet de l'état physiologique des cellules sur la traduction des ARN transfectés .....</b>	<b>148</b>
<b>III/ Effet de l'infection sur la traduction des ARN .....</b>	<b>149</b>
<b>A/ L'infection stimule-t-elle la traduction des ARN viraux ? .....</b>	<b>149</b>
<b>B/ L'infection bloque-t-elle la traduction des ARN poly(A)? .....</b>	<b>151</b>
<b>C/ La protéine NSP3 bloque-t-elle la traduction dépendante de la PABP ? .....</b>	<b>152</b>
<b>IV/ Rôle de la protéine NSP3 sur la traduction des ARN de rotavirus .....</b>	<b>156</b>
<b>A/ La traduction des ARN de rotavirus est dépendante de NSP3 .....</b>	<b>156</b>
<b>B/ Premiers cycles et initiation de la traduction dépendante de NSP3.....</b>	<b>158</b>
<b>V/ Caractéristiques des ARN de rotavirus .....</b>	<b>158</b>
<b>A/ Extrémités non canonique : NSP3 et virulence ? .....</b>	<b>158</b>
<b>B/ Influence des régions non codantes (UTR) sur la traduction des ARN de rotavirus .....</b>	<b>160</b>
1/ <i>Effet de la région non codante en 5' (5' UTR)</i> .....	160
2/ <i>Effet de la région non codante en 3' (3' UTR)</i> .....	163
<b>VI/ Conclusions et perspectives .....</b>	<b>166</b>
 <b>Bibliographie .....</b>	 <b>168</b>

## **Liste des tableaux et figures**

Tableau 1 : Les facteurs impliqués lors de l'initiation de la traduction et leurs fonctions. ....	2
Tableau 2 : Les différentes stratégies appliquées par les virus pour cibler le complexe eIF4F. .....	36
Tableau 3 : Les différentes stratégies appliquées par les virus pour cibler le complexe eIF4F. .....	39
Tableau 4 : Les différentes stratégies appliquées par les virus pour cibler le complexe PIC. .	43
Tableau 5 : Les différentes stratégies appliquées par les virus pour cibler le complexe PIC. .	44
Tableau 6 : Oligonucléotides utilisés pour les mutations des extrémités 3' des rapporteurs...	97
Tableau 7 : Oligonucléotides utilisés pour substituer la 5' UTR des rapporteurs. ....	97
Tableau 8 : Oligonucléotides utilisés pour substituer la 3' UTR des rapporteurs. ....	98
Tableau 9 : Oligonucléotides utilisés durant le protocole de polyadénylation des ARN rapporteurs.....	98
Tableau 10 : Oligonucléotides utilisés pour muter NSP3 RF et insérer la séquence T2A dans les constructions. ....	100
Tableau 11 : Oligonucléotides utilisés en PCR quantitative. ....	105
Tableau 12 : Anticorps utilisés en immunodétection.....	106
Figure 1 : Le complexe ternaire, facteur permettant l'adressage de l'ARN <sup>ti</sup> Met au niveau du PIC.....	3
Figure 2 : Le facteur d'initiation de la traduction eIF4E.....	7
Figure 3 : Le facteur d'initiation de la traduction eIF4A.....	9
Figure 4 : Les facteurs d'initiation de la traduction eIF4B/eIF4H. ....	10
Figure 5 : Le facteur d'initiation de la traduction PABP.....	12
Figure 6 : Le facteur d'initiation de la traduction eIF4G. ....	13
Figure 7 : Représentation schématique de l'initiation de la traduction.....	16
Figure 8 : Modèle de balayage du complexe PIC (Modèle de Spirin).....	18
Figure 9 : Modèle de balayage du complexe PIC (Modèle de Marintchev).....	19
Figure 10 : Représentation schématique de l'élongation de la traduction. ....	23
Figure 11 : Représentation schématique de l'étape de terminaison de la traduction. ....	25
Figure 12 : Représentation schématique de l'étape de recyclage des sous-unités des ribosomes. .....	27
Figure 13 : La voie mTOR : une voie de régulation centrale de l'initiation de la traduction..	30
Figure 14 : eIF2 $\alpha$ : un autre facteur central dans la régulation de l'initiation de la traduction. .....	33
Figure 15 : Stratégies de détournement de la traduction par les virus par ciblage de la coiffe. .....	35
Figure 16 : Stratégies virales ciblant eIF4F via les facteurs eIF4E et eIF4G. ....	37
Figure 17 : Stratégies virales ciblant le complexe PIC via eIF3 et le complexe ternaire (eIF2 $\alpha$ ). .....	42
Figure 18 : Structures secondaires en 5' des ARNm viraux ou Internal Ribosome Entry Site (IRES).....	49
Figure 19 : Distribution des décès causés par les infections au rotavirus dans le monde {Tate, 2012 #359}.....	53
Figure 20 : Les différentes particules de rotavirus.....	55
Figure 21 : Le génome du rotavirus et les protéines virales correspondantes.....	56
Figure 22 : Représentation schématique des ARNm de rotavirus. ....	57



Figure 23 : L'activation de la transcription par la polymérase virale VP1.....	61
Figure 24 : La protéine de la couche externe, VP4.....	63
Figure 25 : La protéine de la couche intermédiaire, VP6.....	64
Figure 26 : La protéine de la couche externe, VP7.....	66
Figure 27 : La protéine non structurale NSP1.....	67
Figure 28 : La protéine non structurale NSP2.....	68
Figure 29 : Représentation schématique de la protéine non structurale NSP5.....	70
Figure 30 : Le cycle du rotavirus. ....	72
Figure 31 : Modèle de réplication et d'assemblage des particules de rotavirus. ....	74
Figure 32 : L'acquisition de la couche externe de la particule virale. ....	76
Figure 33 : Premier modèle de la traduction des ARNm de rotavirus et des ARNm polyadénylés au cours de l'infection par le rotavirus. ....	80
Figure 34 : Représentation des structures cristallographique des domaines de liaison à l'ARN ou à eIF4G de NSP3. ....	81
Figure 35 : Modèle alternatif de traduction des ARNm de rotavirus et des ARNm polyadénylés (D'après {Montero, 2006 #33}). ....	86
Figure 36 : Modèle de traduction des ARNm cellulaires et viraux et d'inhibition de l'export des ARNm cellulaires.....	89
Figure 37 : Généalogie des plasmides codant les ARN rapporteurs Renilla. ....	96
Figure 38 : Généalogie des plasmides codant NSP3. ....	99
Figure 39 : Représentation de la préparation des ARN se terminant par une séquence Rota (GACC) ou Nona (UGUG) ou polyadénylée de rotavirus à l'aide d'une digestion par l'enzyme de restriction BsaI. ....	100
Figure 40 : Représentation des ARNm rapporteurs électroporés.....	108
Figure 41 : Effet de l'infection par les rotavirus de souches RF ou RRV sur la stabilité des ARN.....	110
Figure 42 : L'infection par le rotavirus affecte la traduction des ARNm polyadénylés. ....	111
Figure 43 : Absence d'inhibition de la traduction des ARN polyadénylés par NSP3 seule. ....	113
Figure 44 : Détermination du temps optimal de mesure des activités luciférase après transfection d'ARN par électroporation. ....	115
Figure 45 : Effet de l'expression de la protéine NSP3 sur la traduction d'un ARN EMCV-Fluc et effet de l'absence de coiffe sur la traduction dépendante de NSP3.....	117
Figure 46 : Effet d'une quantité variable de NSP3 sur la traduction d'un ARN rapporteur.....	119
Figure 47 : Les deux domaines de NSP3 sont nécessaires pour stimuler la traduction des ARNm de rotavirus (traduction en trans).....	121
Figure 48 : Principe des ARNm « T2A ».....	123
Figure 49 : Constructions plasmidiques utilisées dans l'approche « T2A ». ....	126
Figure 50 : Effet de la coiffe sur l'activité luciférase des ARN « T2A ». ....	127
Figure 51 : Les deux domaines fonctionnels de NSP3 sont nécessaires à la stimulation la traduction de son propre ARN (traduction en cis). ....	129
Figure 52 : Absence de stabilisation des ARN pris en charge par NSP3. ....	131
Figure 53 : Effet de mutations thermosensibles sur la protéine NSP3.....	133
Figure 54 : Impact de l'origine de la protéine NSP3 lors de la traduction d'ARNm rapporteur aux extrémités 3' variables. ....	135
Figure 55 : Effet de l'extrémité 3' sur la traduction des ARNm de rotavirus.....	136
Figure 56 : Effet de la région 5' non codante (UTR) du gène 4 sur la traduction d'un ARN rapporteur de type rotavirus ou polyadénylé. ....	139
Figure 57 : Effet du changement de contexte nucléotidique de la région 5' non codante du gène 4 sur la traduction d'ARNm rapporteur de type rotavirus. ....	141

<b>Figure 58 : Effet du changement de la région 3' non codante du gène 6 par la région 3' non codante du gène 4. ....</b>	<b>142</b>
<b>Figure 59 : Effet des mutations du 3' UTR de gène 4 sur la traduction d'un ARNm de type rotavirus. ....</b>	<b>143</b>
<b>Figure 60 : Prédiction de structures des différents rapporteurs ARN. ....</b>	<b>146</b>
<b>Figure 61 : Modèles d'inhibition de la traduction cellulaire lors d'infection par le rotavirus. ....</b>	<b>155</b>
<b>Figure 62 : Les domaines de liaison à l'ARN et à eIF4G de NSP3 sont tous les deux nécessaires à la traduction des ARNm de rotavirus.....</b>	<b>157</b>
<b>Figure 63 : Modèles d'initiation de la traduction sur des ARN rapporteurs avec une 5' UTR courte.....</b>	<b>162</b>
<b>Figure 64 : Modèle de terminaison de la traduction sur des ARNm comportant une 3' UTR courte.....</b>	<b>164</b>
<b>Figure 65 : Niveau de traduction de l'ARNm selon l'accessibilité de l'extrémité 3' GACC pour NSP3. ....</b>	<b>165</b>

## **Chapitre 1 : Introduction**

### **Partie I : La traduction**

#### **I/ Généralités**

La traduction est le processus qui permet à la synthèse de protéines à partir d'ARN messagers (ARNm). La traduction est classiquement décomposée en quatre étapes distinctes : l'initiation, étape au cours de laquelle différents facteurs se rassemblent sur les ARNm afin de recruter les différentes sous-unités des ribosomes. L'élongation, phase où les ribosomes se déplacent le long de l'ARNm en synthétisant la protéine. L'étape de terminaison, où les ribosomes achèvent la synthèse de la protéine et se décrochent de l'ARNm. Et enfin l'étape de « recyclage » où les ribosomes ayant fini un cycle sont repris en charge pour un cycle suivant. Au moins 13 facteurs (Tableau 1), eux-mêmes composés de plusieurs sous-unités, vont être nécessaires au déroulement des différentes étapes.

Selon l'état physiologique de la cellule et selon les stimuli reçus, la traduction peut être inhibée ou, à l'inverse, initiée au niveau d'ARNm présents à l'état silencieux. Les ARNm eux-mêmes sont soumis à un contrôle strict avant d'être engagés dans les processus de traduction, afin d'assurer l'absence de synthèse de protéines aberrantes. La présence d'une coiffe en 5', d'une extrémité 3' polyadénylée, l'absence de codon de terminaison prématuré sont plusieurs marqueurs qui déterminent le maintien ou la dégradation de l'ARNm et son engagement dans les processus de traduction. Ces contrôles de l'intégrité des ARNm ont aussi un rôle dans les défenses cellulaires contre les pathogènes, qui portent souvent des marqueurs « PAMP » (Pathogen associated molecular pattern) que la cellule identifie comme étrangers. L'extrémité 5' coiffée des ARNm est par exemple un marqueur capital dans la cellule, et certains pathogènes synthétisent des ARN 5' triphosphate qui vont être reconnus comme étant du non soi.

**Tableau 1 : Les facteurs impliqués lors de l'initiation de la traduction et leurs fonctions.**

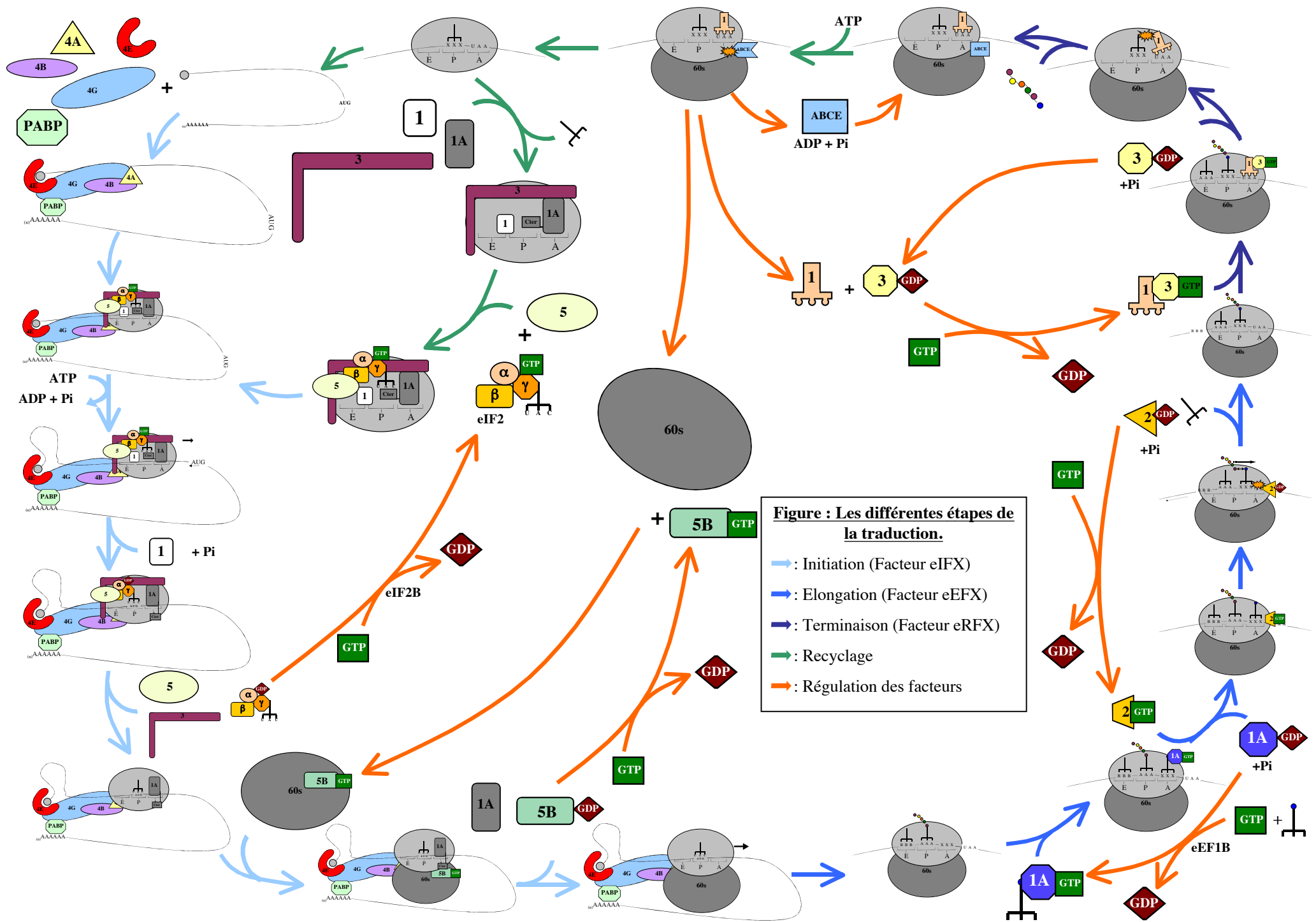
<b><u>Facteurs</u></b>	<b><u>Nombre de sous-unités / poids moléculaire</u></b>	<b><u>Fonctions</u></b>
eIF2	3 / 36; 38 et 51 kDa	Forme le complexe ternaire avec le GTP et le ARN <sup>i</sup> pour le charger sur la sous unité 40s.
eIF2B	5 / 34; 39; 50; 59 et 80 kDa	Permet de régénérer le GTP du facteur eIF2 via son activité GAP
eIF3	13 / total : 800 kDa	Lie 40s, eIF1, eIF5 et eIF4G. Aide au recrutement d'eIF2 au 40s. Permet l'attachement du 43s sur l'ARN <sup>m</sup> . Empêche l'association entre 40s et 60s.
eIF5	1 / 49 kDa	GTPase activating protein : aide à l'hydrolyse du GTP d'eIF2 lors de la reconnaissance de l'AUG
eIF1	1 / 12 kDa	Permet balayage et reconnaissance fidèle de l'AUG. Stimule association complexe ternaire et 40s. Empêche hydrolyse prématurée du GTP d'eIF2 par eIF5
eIF1A	1 / 16,5 kDa	Agit avec eIF1 : aide au balayage et reconnaissance AUG. Aide association eIF2 avec 40s
eIF4E	1 / 24,5 kDa	Lie la coiffe en 5' des ARN <sup>m</sup>
eIF4A	1 / 46 kDa	Hélicase de type DEAD box dépendante de l'ATP
eIF4B	1 / 69,3 kDa	Lie l'ARN et stimule l'activité hélicase d'eIF4A
eIF4H	1 / 27,4 kDa	Homologue d'eIF4B. Lie l'ARN et augmente l'activité hélicase d'eIF4A
eIF4G	1 / 175 kDa	Lie l'ARN, eIF3, eIF4E, eIF4A, PABP. Permet arrimage du 43s et stimule activité hélicase d'eIF4A.
eIF5B	1 / 138,9 kDa	GTPase qui lie 60s. Permet association 40s et 60s.
PABP	1 / 70 kDa	Lie l'ARN polyadénylé, eIF4G, eRF3. Stimule liaison d'eIF4F à la coiffe.

Tous les virus utilisent la machinerie de traduction cellulaire pour pouvoir exprimer leurs matériels génétiques. De ce fait, différentes stratégies vont être mises en œuvre par les virus pour détourner la machinerie de traduction à leurs profits et éviter les contrôles ou inhiber les différents points de régulation qui pourraient limiter ou inhiber les différentes étapes de traduction.

Ces différents aspects seront présentés dans cette introduction : dans un premier temps, l'étape d'initiation de la traduction sera particulièrement détaillée ainsi que les facteurs impliqués, puis le déroulement des différentes étapes, les points de régulation seront présentés. D'autre part, je détaillerai différents exemples de détournement de la machinerie de traduction utilisés par différents virus.

## **II/ Voie canonique de la traduction**

La traduction est un phénomène cyclique où les quatre étapes citées précédemment (initiation, élongation, terminaison et recyclage) s'enchaînent les unes après les autres (Figure : « Les différentes étapes de la traduction »).



## A/ L'initiation de la traduction

L'initiation de la traduction est l'étape qui va conduire au recrutement d'un ribosome 80S sur l'ARN messager (ARNm) cible au niveau d'un codon d'initiation avant la synthèse de la protéine proprement dite. Cette étape est découpée en sous étapes impliquant différents complexes protéiques qui vont d'une part préparer les différentes sous-unités du ribosome et d'autre part recruter ces sous-unités ribosomiques au niveau de l'ARNm.

### 1/ Assemblage du complexe de préinitiation (43s PIC)

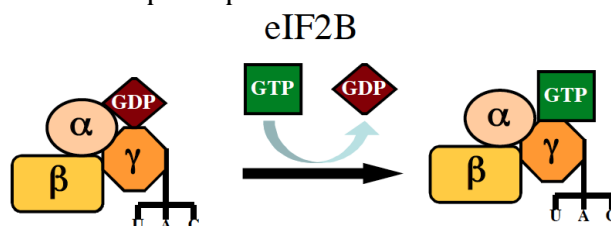
L'initiation de la traduction débute par la formation d'un complexe composé de la sous-unité 40S du ribosome issue de l'étape de recyclage, ou directement de l'étape de biogénèse des sous-unités ribosomiques, et des facteurs eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5. Cet ensemble va recruter le complexe ternaire (TC) constitué par le facteur eIF2 (Asano et al., 2000; Pisarev et al., 2007b) et l'ARN de transfert initiateur Méthionine (ARNti Met) pour former le complexe de préinitiation 43S ou « PIC ».

#### a/ Le complexe ternaire

Lors de la formation du complexe ternaire, eIF2 est associé à l'ARNti Met et à une molécule de GTP au niveau de sa sous-unité  $\gamma$  (Figure 1). La présence des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  augmenterait grandement l'affinité (de 100 fois) d'eIF2 $\gamma$  pour l'ARNti Met (Naveau et al., 2010) mais on ignore s'il y a interaction directe entre eIF2 $\alpha$  et/ou  $\beta$  avec l'ARNti Met. La présence d'interaction Watson-Crick en position A1-U72 spécifique dans la boucle acceptrice de l'ARNti et la nature des paires de bases 50-64 et 51-63 dans la queue T de l'ARNti (Farruggio et al., 1996) est l'une des caractéristiques qui différencient un ARNt d'initiation d'un ARNt d'élongation et qui permet l'interaction avec le facteur eIF2. C'est ce complexe eIF2+ARNti Met qui est ensuite incorporé avec la sous-unité 40S du ribosome pour former le PIC 43S.

**Figure 1 : Le complexe ternaire, facteur permettant l'adressage de l'ARNti Met au niveau du PIC.**

Le complexe ternaire est composé du facteur eIF2 (divisé en trois sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ), de l'ARN de transfert initiateur Méthionine et d'une molécule de GTP ou GDP liée à eIF2 $\alpha$ . Lors de la reconnaissance du codon d'initiation, l'hydrolyse du GTP va permettre différents changements au niveau du complexe PIC conduisant à l'initiation de la traduction à proprement parlé. Le GDP est remplacé par une molécule de GTP via l'action d'eIF2B.



### *b/ Le facteur eIF3*

Le facteur eIF3 est un complexe, composé de 13 sous-unités chez les mammifères (de la sous-unité « a » à « m »), impliqué dans le recrutement du complexe ternaire pour la formation du PIC, mais qui serait aussi impliqué dans l'attachement du complexe PIC à l'ARNm, et dans l'étape de « balayage » de la partie 5' non codante. eIF3 empêche aussi l'association prématurée de la sous-unité 60S du ribosome et fait partie des facteurs impliqués lors du recyclage des sous-unités du ribosome pour la formation de nouveau PIC. Des reconstitutions à partir d'images de cryo-microscopie électronique ont permis de voir qu'eIF3 fixe la sous-unité 40S du ribosome au niveau du canal d'entrée et de sortie de l'ARNm ce qui est en accord avec le rôle d'eIF3 lors de l'attachement du complexe PIC sur l'ARNm. Il a par la suite été montré *in vitro* qu'eIF3 de levure augmente fortement la liaison du complexe PIC avec un ARNm coiffé (Mitchell et al., 2010). Le même phénomène semble être observé chez les mammifères où des travaux montrent que le recrutement du PIC 43S s'effectue directement par l'interaction avec eIF3 ou eIF5 (Asano et al., 2001; Pestova et al., 2007). Le recrutement du PIC 43S par interaction entre eIF4G et eIF3, est appuyé par d'autres études : une compétition entre eIF3 complet et la sous-unité eIF3e pour la fixation à eIF4G a été observé *in vitro*. De plus, cette compétition conduit à une inhibition de la traduction qui pourrait être donc due soit à une diminution du recrutement du PIC 43S sur l'ARN, soit à l'inhibition du recrutement du complexe ternaire au niveau de la sous-unité 40S du ribosome (Korneeva et al., 2000; LeFebvre et al., 2006).

### *c/ Le facteur eIF5*

Ce facteur possède, sur sa partie N terminale, un domaine avec une activité GTPase (GAP) permettant l'hydrolyse du GTP lié à eIF2 $\gamma$  lors de la reconnaissance du codon d'initiation, et en partie C terminale, un domaine de liaison à la sous-unité  $\beta$  du facteur eIF2. Plus récemment, il a été montré qu'eIF5 est largement retrouvé associé avec eIF2 en dehors du complexe ternaire (Singh et al., 2006). Par la suite, il a été montré chez la levure qu'eIF5 possède aussi une fonction inhibitrice de dissociation du GDP (GDI) indépendante de la fonction GAP et permet de réguler la régénération du GDP d'eIF2 en GTP par eIF2B (Jennings and Pavitt, 2010). eIF5 permettrait de plus le lien entre le facteur eIF3 et le complexe ternaire, ce qui permet le recrutement de ce dernier au niveau de la sous-unité 40S du ribosome (Bieniossek et al., 2006; Conte et al., 2006).

### *d/ Le facteur eIF1*

Ce facteur d'environ 13kDa joue sur plusieurs plans : il serait impliqué dans l'étape de recyclage des ribosomes car eIF1 est capable de provoquer la dissociation du ribosome de l'ARNm et de l'ARNt encore dans le site P du ribosome. Son interaction avec la sous-unité 40S du ribosome,

permet de garder cette dernière sous une conformation ouverte, conduisant à la formation du PIC via le recrutement du complexe ternaire (Cheung et al., 2007). eIF1 est aussi utilisé pour la reconnaissance fidèle du codon d'initiation car, en maintenant la conformation ouverte du ribosome, il favorise l'étape de « balayage » et, en verrouillant le site P, il empêche la reconnaissance de mauvais codons d'initiation par l'ARN<sup>ti</sup> Met (Hinnebusch, 2011; Jackson et al., 2010). Sa présence permettrait aussi d'empêcher le recrutement prématuré de la sous-unité 60S du ribosome en bloquant une interaction importante entre les deux sous-unités 40S et 60S du ribosome (Rabl et al., 2011). Lors de la reconnaissance du codon d'initiation, eIF1 est éjecté du PIC permettant d'une part un changement de conformation de la sous-unité 40S du ribosome vers une forme dite « fermée » et, d'autre part, le recrutement de la sous-unité 60S du ribosome (Nanda et al., 2009).

### e/ Le facteur eIF1A

Ce facteur de 16kDa participe, avec eIF3 et eIF1, au recyclage des ribosomes. eIF1 et eIF1A participe de manière coopérative à maintenir la sous-unité 40S du ribosome dans la conformation « ouverte », afin de permettre le recrutement du complexe ternaire et de favoriser le « balayage » le long de l'ARN<sup>m</sup> (Passmore et al., 2007). D'une manière similaire à eIF1, la partie C terminale de eIF1A verrouille le site P, empêchant le recrutement prématuré de eIF5B et de la sous-unité 60S du ribosome. Lors de la reconnaissance du codon d'initiation par l'ARN<sup>ti</sup> Met, la partie C terminale d'eIF1A subit un changement de conformation, la déplaçant du site P. eIF1 interagirait alors avec eIF5 aidant à l'hydrolyse du GTP d'eIF2. Une fois le codon d'initiation reconnu et eIF2 ainsi qu'eIF5 éjectés du PIC, la partie C terminale d'eIF1A permettrait le recrutement de la sous-unité 60S du ribosome via une interaction avec eIF5B (Acker et al., 2006; Fringer et al., 2007; Marintchev et al., 2003; Olsen et al., 2003). Lors de l'étape de recyclage du ribosome, les facteurs eIF1, eIF1A et eIF3 vont interagir avec la sous-unité 40S du ribosome séparée de l'ARN<sup>m</sup>, de l'ARN<sup>t</sup> et de la sous-unité 60S.

### 2/ Assemblage du complexe eIF4F et recrutement du complexe de préinitiation au niveau de l'ARN<sup>m</sup>

Typiquement, un ARN<sup>m</sup> cellulaire est composé d'une extrémité 5' coiffée, d'une région non codante (ou Région non traduite dite « 5' UTR »), d'une région codante (ORF) débutant par le codon d'initiation (AUG) et se terminant par un des trois codons de terminaison, et enfin d'une région non codante 3' (« 3' UTR ») et qui est polyadénylée à son extrémité 3'. Ces régions, codantes ou non codantes, sont de longueurs variables et peuvent être structurées. Bien qu'il ait été montré que, dans des systèmes de traduction *in vitro* à partir de levure, le complexe PIC peut lier et « balayer » la région 5'UTR non structurée d'un ARN<sup>m</sup> sans l'aide d'autres facteurs (Mitchell et



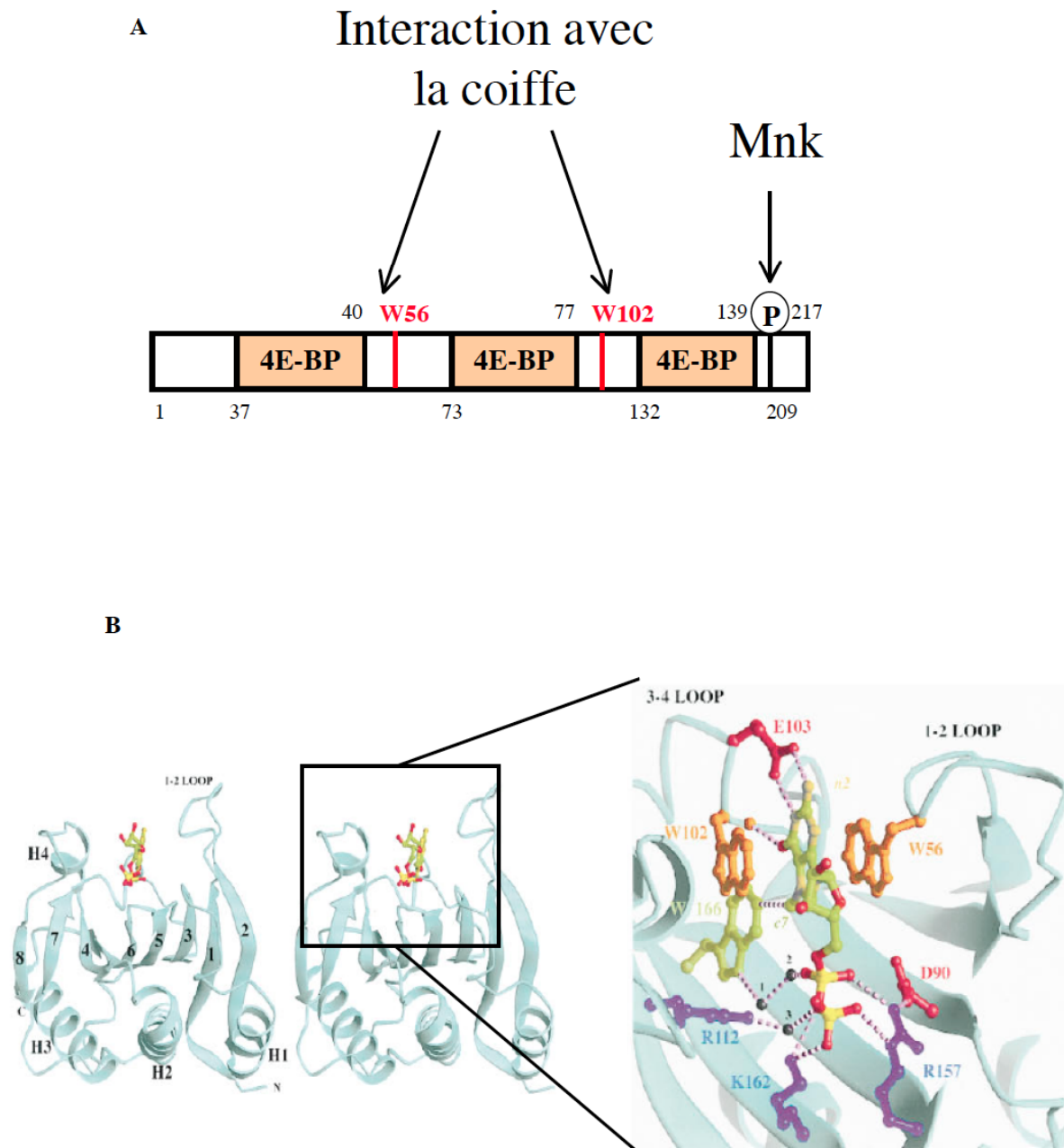
al., 2010; Pestova and Kolupaeva, 2002), pour un ARNm ayant une région 5' structurée, différents facteurs doivent être assemblés pour préparer l'ARN à recevoir le complexe 43S. Ces facteurs eIF4E, eIF4A et eIF4G forme le complexe eIF4F auxquels s'associeront eIF4B et la PABP.

#### a/ Le facteur eIF4E

Ce facteur de 25kDa se fixe à la coiffe à l'extrémité 5' de l'ARNm (Figure 2). La coiffe est constituée d'une guanosine méthylée en position 7 reliée au premier nucléotide par une liaison triphosphate 5'-5' (Niedzwiecka et al., 2002; Sonenberg et al., 1978; Sonenberg et al., 1979). La structure d'eIF4E, en complexe avec la coiffe, montre que la 7-méthyl guanosine est prise entre un empilement de deux tryptophanes de part et d'autre d'une cavité d'eIF4E (Marcotrigiano et al., 1997). L'interaction d'eIF4E, avec le nucléotide proximal de l'ARNm et les phosphates, permet de stabiliser la fixation d'eIF4E au niveau de la coiffe (von der Haar et al., 2004). eIF4E possède aussi un domaine d'interaction avec eIF4G ou 4E-BP, chacun de ces facteurs permet un changement de conformation d'eIF4E stabilisant la liaison à la coiffe (Gross et al., 2003; Volpon et al., 2006; Youtani et al., 2000). Alors que l'interaction d'eIF4E avec eIF4G permet l'initiation de la traduction de l'ARNm cible, l'interaction avec 4E-BP conduit à une inhibition de l'initiation, car 4E-BP empêche l'interaction d'eIF4E avec eIF4G (Pause et al., 1994). La phosphorylation de 4E-BP par la kinase mTOR va empêcher son interaction avec eIF4E rendant ce dernier libre d'interagir avec eIF4G (Gingras et al., 1999; Gingras et al., 2001). Enfin, chez les métazoaires, eIF4E lui-même peut être phosphorylé par les kinases Mnk1 et 2 présentes sur eIF4G (Fukunaga and Hunter, 1997; Pyronnet et al., 1999; Waskiewicz et al., 1997). Cependant, l'effet de la phosphorylation de eIF4E sur la traduction reste peu comprise : celle-ci semble obligatoire pour un développement normal de la drosophile (Lachance et al., 2002) alors que l'absence de phosphorylation n'a pas d'effet sur le développement de la souris (Furic et al., 2010; Ueda et al., 2004). De plus, selon les conditions expérimentales, cette phosphorylation peut conduire à une augmentation (Kaspar et al., 1990; Manzella et al., 1991) ou à une diminution de la traduction (Knauf et al., 2001; Morley and Naegele, 2002).

**Figure 2 : Le facteur d'initiation de la traduction eIF4E.**

(A) Représentation des différents domaines du facteur eIF4E. eIF4E est composé de trois domaines de liaison à la 4E-BP et possède aussi deux tryptophanes en position 56 et 102 impliqués dans la liaison à la coiffe en 5' des ARNm. Un site de phosphorylation par la kinase Mnk est situé sur une sérine en position 209. (B) Structures obtenues par cristallographie d'eIF4E de souris lié à la coiffe d'un ARNm et détail de l'interaction entre la coiffe et les deux tryptophanes W56 et W102 (en orange) (Tiré de (Marcotrigiano et al., 1997)).



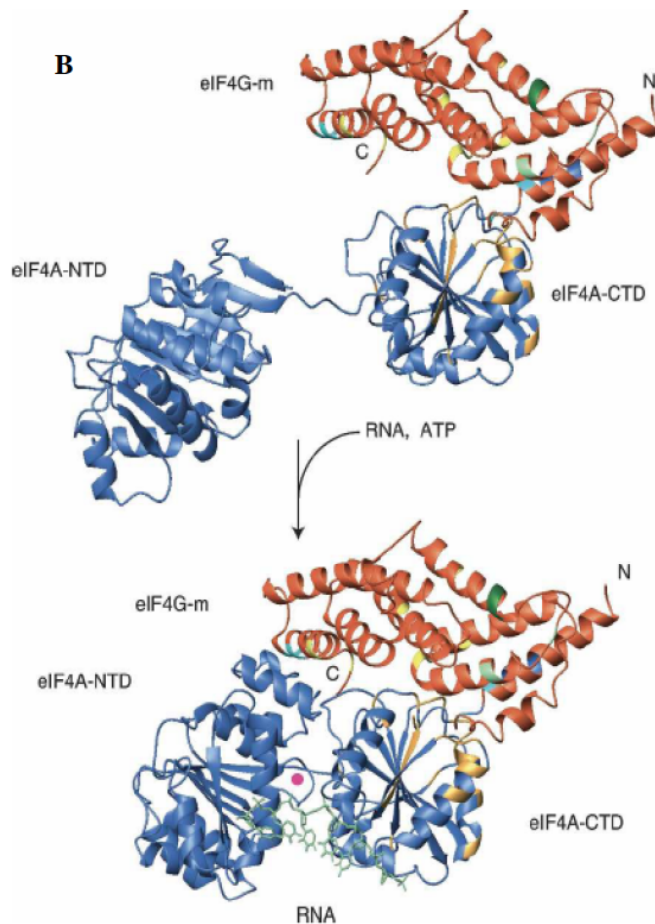
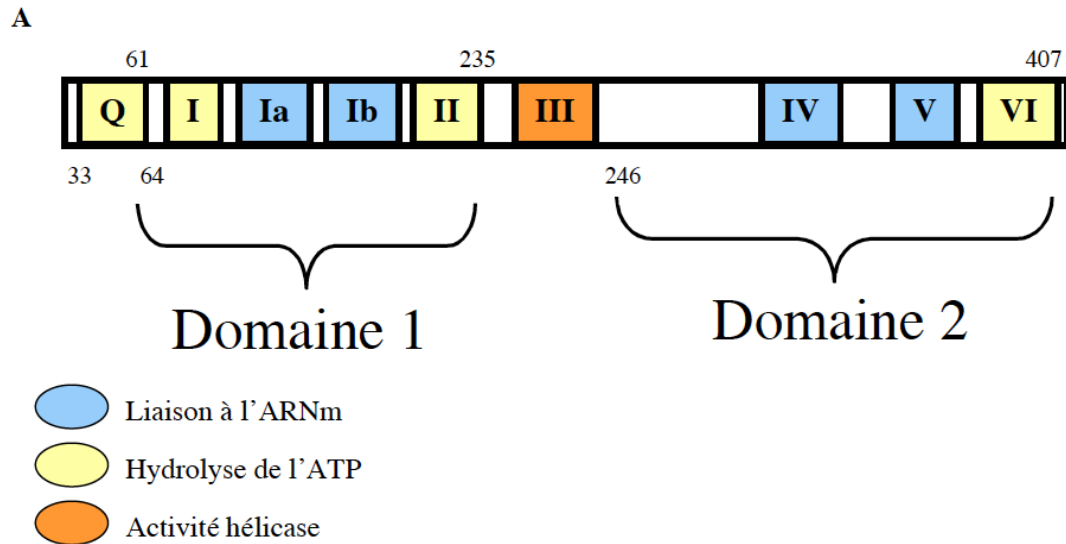
***b/ Le facteur eIF4A***

Le facteur eIF4A est une hélicase de 46kDa de type DEAD-box RNA hélicase dont l'activité dépend de l'ATP (Figure 3, (Cordin et al., 2006)). Sa structure a permis de montrer que son interaction avec eIF4G maintient eIF4A dans une conformation active aboutissant à la déstructuration du 5' UTR de l'ARNm cible (Caruthers et al., 2000; Hilbert et al., 2011; Nielsen et al., 2011; Oberer et al., 2005; Ozes et al., 2011; Schutz et al., 2008). L'association d'eIF4A avec eIF4B ou eIF4H permettrait d'augmenter l'affinité d'eIF4A pour l'ARN bien que les conditions favorisant son association avec eIF4B ou eIF4H ne soient pas déterminées (Rogers et al., 2001; Rozen et al., 1990). Enfin plus récemment, des travaux ont montré que la présence du facteur eIF4E favorise l'activité hélicase d'eIF4A, vraisemblablement en induisant un changement de conformation via eIF4G (Feoktistova et al., 2013).

Bien qu'il semble de plus en plus clair qu'eIF4A intervienne lors de la déstructuration du 5' UTR avec des structures peu stables de l'ARNm et lors du recrutement du PIC, il semblerait que d'autres hélicases comme Dhx29 (Parsyan et al., 2009) ou Ddx3 (Lai et al., 2008) jouent un rôle lors de l'étape de balayage de 5' UTR particulièrement structurées (Abaeva et al., 2011; Pisareva et al., 2008).

**Figure 3 : Le facteur d'initiation de la traduction eIF4A.**

(A) Représentation des différents domaines du facteur eIF4A. Ce facteur est composé de trois domaines, chacun comportant des signatures spécifiques de domaine à activité ATPase, capable de lier l'ARNsb ou ayant une activité hélicase (Cordin et al., 2006). (B) Modèle d'interaction entre le complexe eIF4G et eIF4A (sous forme ouverte ou fermée) et l'ARNm (Tiré de (Oberer et al., 2005)).



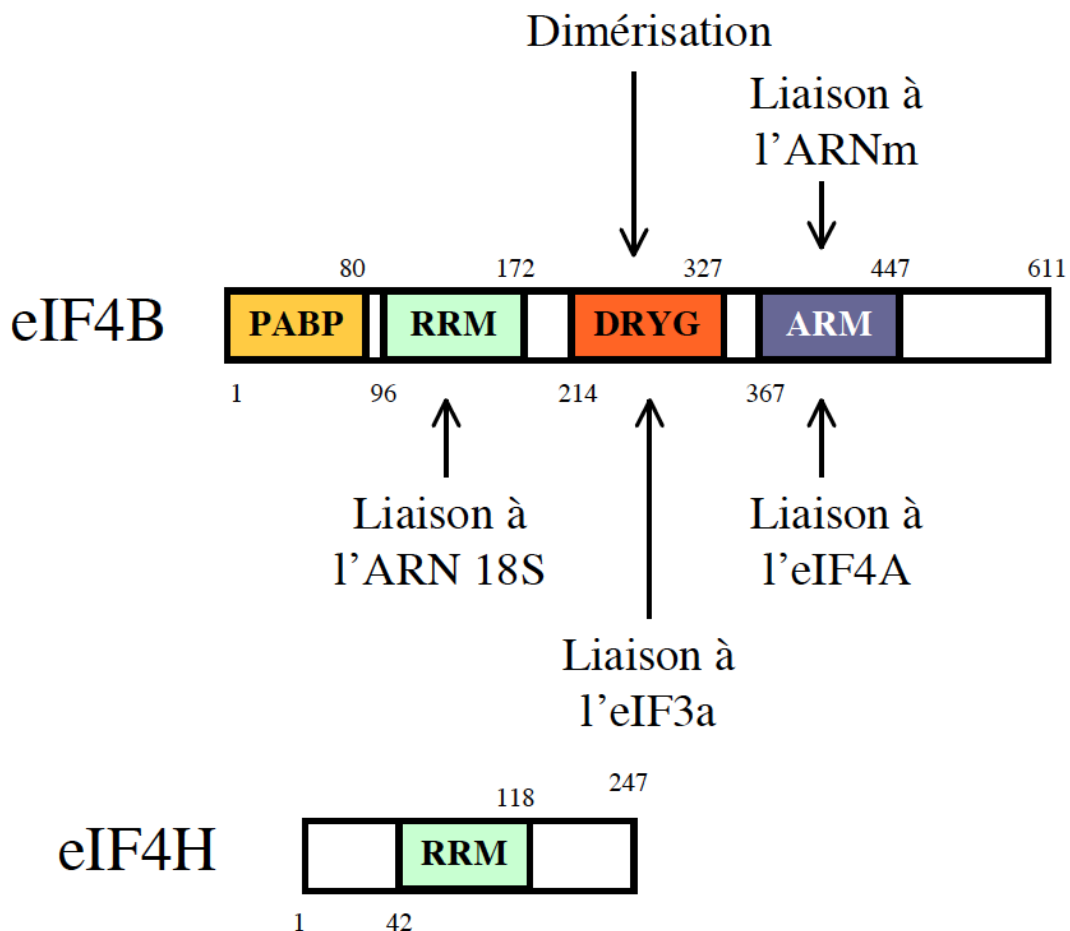
### c/ Les facteurs eIF4B et eIF4H

Le facteur eIF4B (69kDa) est une protéine possédant un domaine de liaison à l'ARN et un domaine de liaison à eIF3 ce qui constitue un lien supplémentaire, en plus du lien entre eIF4G et eIF3, entre l'ARNm et le complexe PIC 43S lors du recrutement du PIC (Figure 4). eIF4B stimule l'activité hélicase et ATPase d'eIF4A : un modèle a été proposé où, dans un premier temps, eIF4B interagirait avec eIF4G, ce dernier changerait alors de conformation et permettrait l'interaction entre eIF4A, eIF4B, l'ATP et l'ARN (Nielsen et al., 2011; Ozes et al., 2011).

eIF4H (27kDa) est similaire à eIF4B mais sans la partie C terminale, responsable de la liaison d'eIF4B à l'ARN. De ce fait, eIF4H est moins efficace qu'eIF4B pour stimuler l'activité hélicase d'eIF4A (Rozovsky et al., 2008). Les déterminants qui vont permettre l'intégration de l'un ou l'autre de ces facteurs pour stimuler l'activité hélicase d'eIF4A dans le complexe eIF4F ne sont pas connus.

#### Figure 4 : Les facteurs d'initiation de la traduction eIF4B/eIF4H.

Représentation des différents domaines des facteurs eIF4B et eIF4H. Ces facteurs sont tous deux composés d'un domaine de liaison à l'ARN 18S. eIF4B comporte en plus d'un domaine de liaison à la PABP, d'un domaine permettant la liaison à eIF3a et la dimérisation d'eIF4B, et d'un domaine de liaison à l'ARNm et à eIF4A.



*d/ Le facteur PABP ; « Poly(A) Binding Protein »*

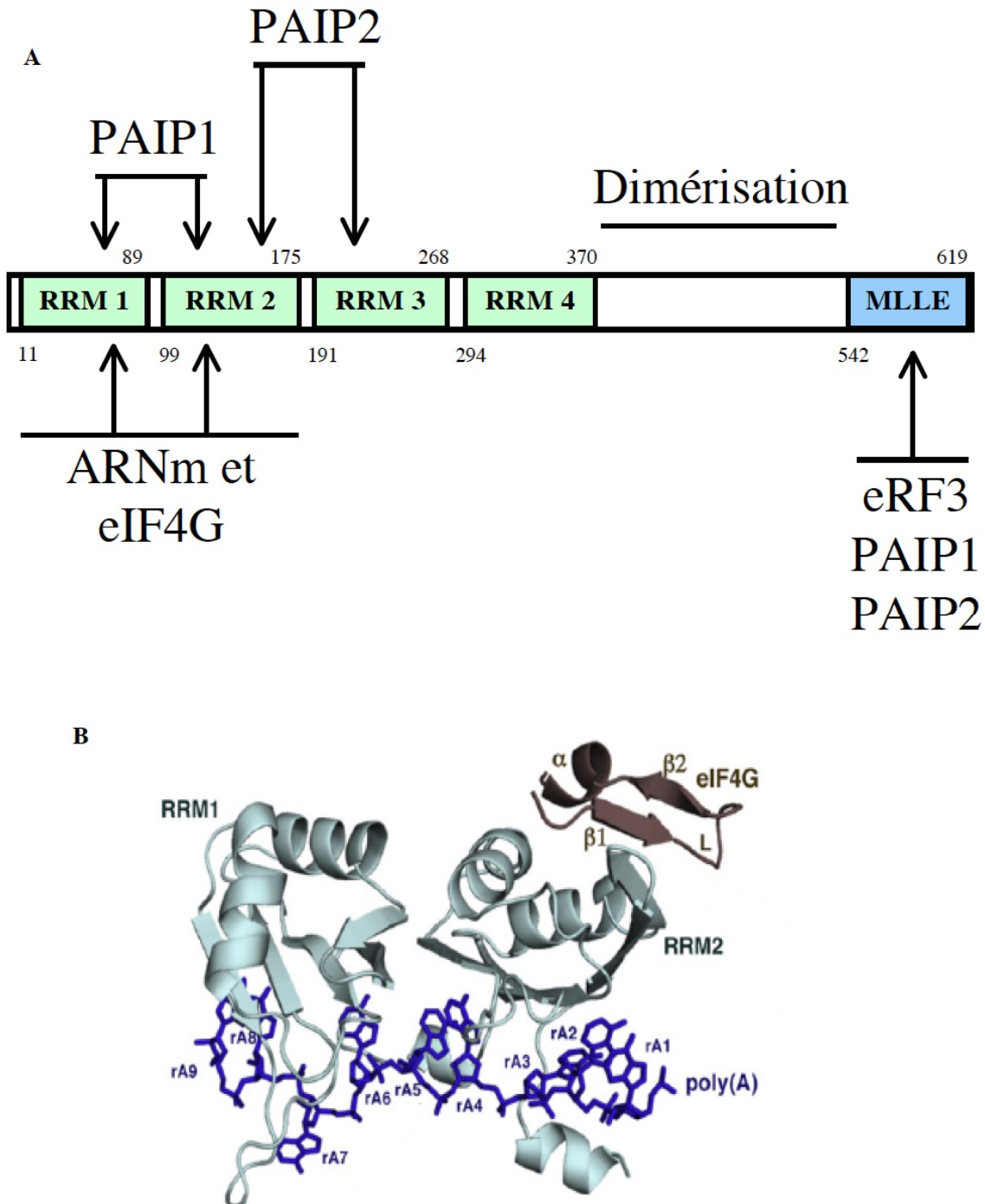
La polyA Binding Protein est un facteur de 70kDa possédant 4 motifs N terminaux de reconnaissance de l'ARN (RNA Recognition Motif ou RRM) et un domaine C terminal PABPC (Figure 5). Les domaines RRM 1 et 2 sont impliqués simultanément dans la reconnaissance de l'extrémité 3' polyadénylée de l'ARNm et dans l'interaction avec le facteur eIF4G par un mécanisme d'allostérie coopérative (Safaei et al., 2012) (Figure 5b). Il a aussi été caractérisé une interaction entre la PABP et le facteur de terminaison eRF3 : cette interaction serait notamment impliquée dans les mécanismes du Nonsense Mediated Decay (NMD) permettant la détection des codons de terminaison prématurés au sein d'un ARNm (Ivanov et al., 2008). Enfin, la PABP serait aussi impliquée dans la régulation de la traduction par les microRNA (miRNA) bien que cela soit sujet à débats (Fabian et al., 2009; Humphreys et al., 2005).

*e/ Le facteur eIF4G*

Le facteur « eIF4G » regroupe deux protéines codées par deux gènes différents eIF4G1 et eIF4G2 qui génèrent de multiples isoformes par l'usage de promoteurs, sites d'épissages et codon d'initiation alternatifs (Byrd et al., 2005; Coldwell et al., 2012). eIF4G est une protéine dite d'échafaudage impliquée dans le rassemblement des différents facteurs présentés précédemment. eIF4G possède des domaines de liaison à eIF4E, PABP, eIF3, aux kinases Mnk et à l'ARN lui permettant d'accentuer la liaison du complexe eIF4F à l'ARNm en plus des liaisons eIF4E/coiffe, PABP/poly(A) décrites précédemment (Figure 6). Le complexe PIC est ensuite recruté via l'interaction entre eIF4G et eIF3, ce dernier possédant aussi des domaines de liaison à l'ARNm permettant de stabiliser davantage l'interaction entre le PIC et l'ARNm.

**Figure 5 : Le facteur d'initiation de la traduction PABP.**

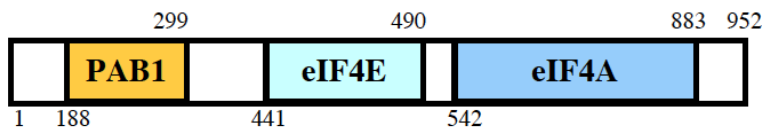
(A) Représentation des différents domaines du facteur PABP. Ce facteur est composé de quatre domaines RNA Recognition Motif (RRM) permettant la liaison à l'ARN, ou à eIF4G ; d'un domaine de dimérisation et d'un domaine MLLE permettant l'interaction avec le facteur de terminaison eRF3 ou ses régulateurs PAIP1 et 2. (B) Structure cristallographique du complexe comprenant un ARN poly(A)<sub>11</sub>, la PABP des acides aminés 1 à 190 (RRM1 et RRM2) et d'eIF4G de l'acide aminé 178 à 203 correspondant au site de fixation à la PABP (Safaei et al., 2012).



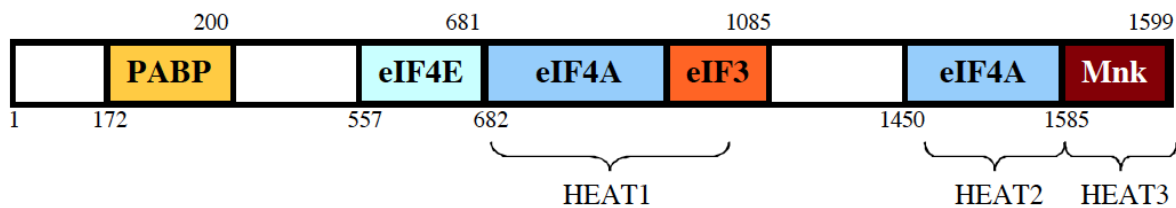
**Figure 6 : Le facteur d'initiation de la traduction eIF4G.**

(A) Représentation des différents domaines du facteur eIF4G chez la levure et chez l'Homme. Les deux formes possèdent un domaine de liaison à la PABP, eIF4E et eIF4A. eIF4G humain comporte un domaine de liaison à eIF3, un domaine supplémentaire de liaison à eIF4A et un domaine de liaison à la kinase Mnk d'eIF4E. (B) Structures obtenues en SAXS du complexe entre eIF4A et les domaines HEAT d'eIF4G. Les structures obtenues en cristallographie d'eIF4A et du HEAT-1 d'eIF4G ont été insérées dans la structure obtenue en SAXS (Tiré de (Nielsen et al., 2011)).

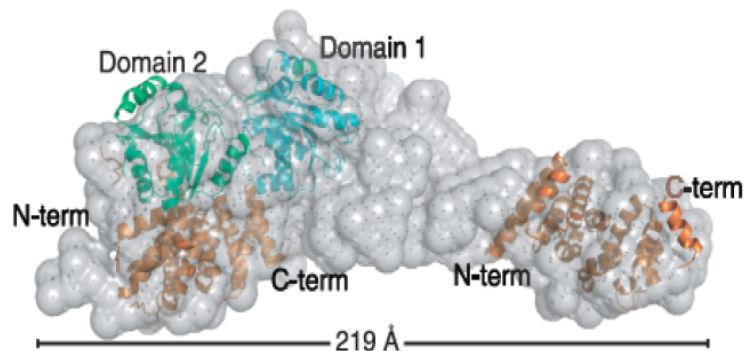
### Levure



### Humain



**B**





### *f/ Modèle de circularisation de l'ARNm et synergie*

Ces interactions, entre eIF4E et eIF4G d'une part, et entre eIF4G et la PABP d'autre part, ont permis de poser un modèle de circularisation de l'ARN : l'interaction entre eIF4E et la coiffe en 5' de l'ARN d'une part, la PABP et l'extrémité poly(A) en 3' d'autre part ; et, finalement, entre eIF4E et la PABP avec eIF4G conduit à la pseudo-circularisation de l'ARNm (Pestova et al., 2007). Ce modèle a été considéré comme le mécanisme nécessaire pour une traduction efficace de l'ARNm cible et la synergie entre la coiffe et l'extrémité polyadénylée. Une explication pour décrire l'utilité de la circularisation est que le recyclage des ribosomes serait facilité par la mise en place de ce genre de complexe. Cependant, il existe des évidences montrant que cette circularisation n'est pas obligatoire pour induire une traduction de l'ARN : des expériences en levure ont notamment montré que la suppression de cette circularisation n'affecte pas la traduction globale (Park et al., 2011a; Tarun et al., 1997).

Une autre explication peut être proposée faisant la part sur le rôle possible de la circularisation et sur le fait que celle-ci n'est pas obligatoire pour permettre la traduction. Récemment, il a été montré qu'il existe des interactions coopératives au sein du complexe eIF4F : par exemple l'affinité d'eIF4E pour la coiffe est augmentée s'il interagit avec eIF4G (Gross et al., 2003), la même observation a été faite entre la PABP et l'extrémité polyadénylée dont l'affinité augmente s'il y a interaction avec eIF4G (Safaei et al., 2012). Si on considère que toutes choses tendent vers un état le plus thermodynamiquement stable, qui nécessite le moins d'énergie possible, alors ce modèle de circularisation prend son sens avec les données d'associations coopératives. Ainsi, le complexe eIF4F est d'autant plus stable lorsque les facteurs sont tous regroupés ce qui appuie l'idée qu'il est favorable d'avoir à la fois l'interaction entre les extrémités 5' et 3' de l'ARN, respectivement via eIF4E et la PABP (Kuhn and Wahle, 2004).

### *3/ Etape de « balayage » de l'ARN par le PIC : reconnaissance du codon d'initiation*

Les structures secondaires des régions non traduites et l'environnement du codon d'initiation sont déterminants pour l'efficacité de l'initiation de la traduction.

#### *a/ « Balayage » et régions non traduites*

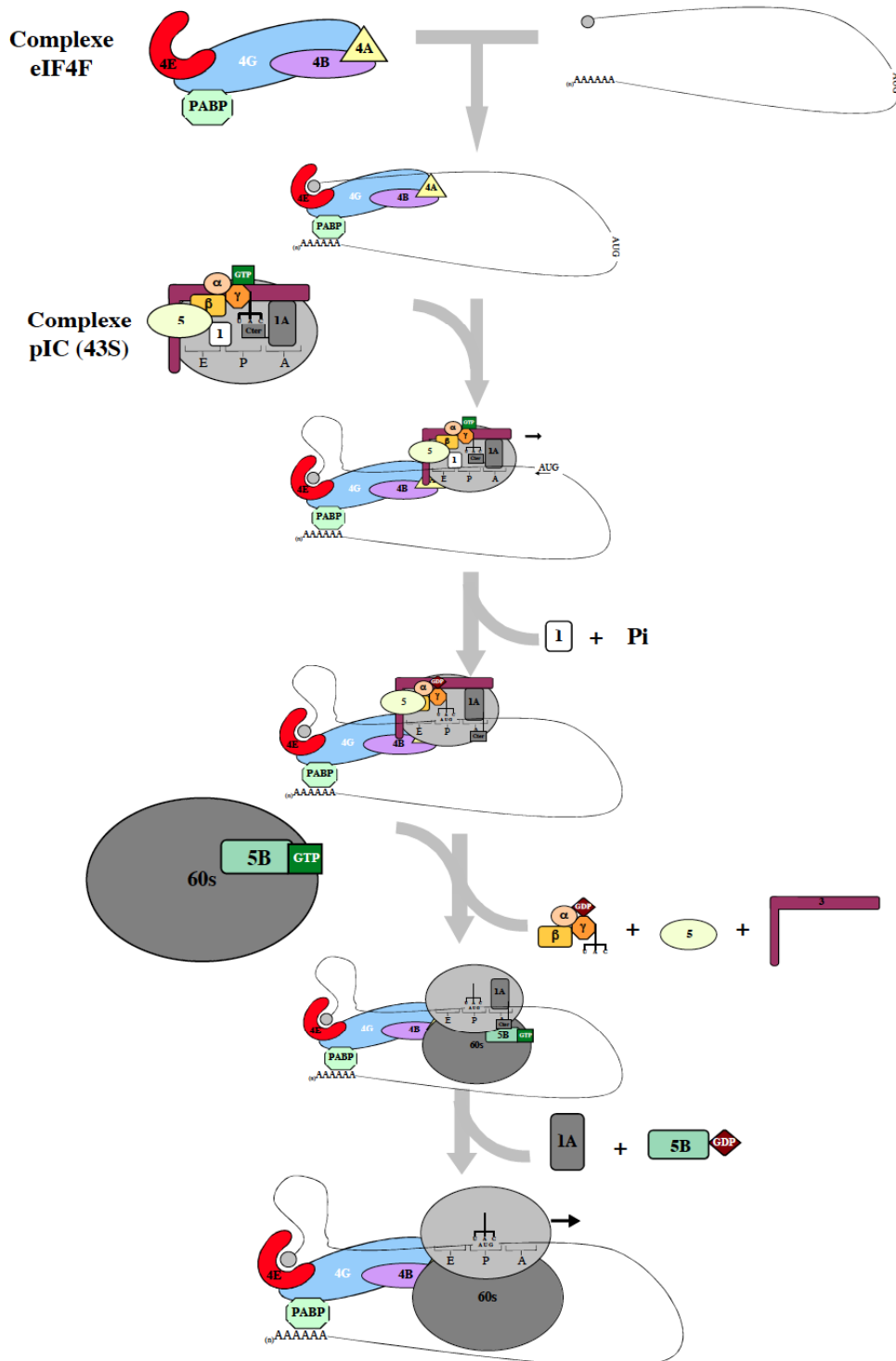
Une fois recruté au niveau de l'ARN, le PIC doit « chercher », par une étape de « balayage » le long de la partie 5' non codante de l'ARN, le codon d'initiation de la séquence codante (Figure 7). Durant cette étape de balayage, le complexe PIC est arrimé sur l'ARN sous une conformation ouverte rendant la sous-unité 40S compétente pour une progression efficace le long de l'ARN. Comme indiqué plus haut, les facteurs eIF1 et eIF1A sont impliqués dans le maintien de cette

conformation ouverte (Pestova and Kolupaeva, 2002). Lors de la reconnaissance du codon d'initiation par l'ARN<sup>t</sup>i Met, le facteur eIF1, qui occupe une partie du site P du ribosome, doit être éjecté du PIC à cause de l'encombrement stérique entre ce facteur et l'ARN<sup>t</sup>i Met (Rabl et al., 2011). La conséquence de ce processus est, dans un premier temps, l'hydrolyse du GTP du facteur eIF2 en GDP, et dans un deuxième temps, le passage à une conformation fermée du complexe (Passmore et al., 2007). Ce processus suggère aussi que seule une interaction forte entre codon et anticodon peut permettre l'éjection du facteur eIF1, celui-ci servant de « verrou » à l'engagement total de l'ARN<sup>t</sup>i Met dans le site P et de ce fait, limitant les mauvais appariements codon/anticodon (Rabl et al., 2011).

Le complexe 43S est capable, de lui-même, de se déplacer le long d'un ARN dont la partie 5' est non structurée. Mais dans le cas d'ARN<sup>m</sup> eucaryotes dont les régions 5' non codantes sont structurées, le complexe eIF4F, en plus de permettre l'attachement du PIC sur l'ARN, permet la déstructuration de l'ARN et ainsi la progression du PIC. L'action des hélicases, comme eIF4A et Dhx29 chez les mammifères ou Ded1 chez la levure, va être importante pour permettre cette déstructuration. Aujourd'hui, les données semblent montrer que le facteur eIF4A aurait plutôt un rôle dans la déstructuration d'ARN<sup>m</sup> dont les structures seraient moyennement stables. A l'inverse, l'hélicase Dhx29 serait plus impliquée dans la déstructuration des régions non codantes avec des structures d'ARN stables et difficiles à défaire (Abaeva et al., 2011; Pisareva et al., 2008). Cependant, d'autres travaux montrent que l'hélicase Dhx29 serait quasi omniprésente lors de la formation du complexe 48S puisque le fait d'éteindre l'expression de Dhx29 conduit à une diminution de la traduction d'une grande partie des ARN<sup>m</sup> cellulaires y compris de ceux qui ne sont pas composés de régions 5' non codantes très structurées (Parsyan et al., 2009).

**Figure 7 : Représentation schématique de l'initiation de la traduction.**

L'ARNm est pris en charge par le complexe eIF4F permettant l'arrimage du complexe PIC. S'en suit le balayage de l'ARNm et la reconnaissance du codon d'initiation qui conduit à l'hydrolyse du GTP et au relargage d'eIF1. Le complexe ternaire, et les facteurs eIF3 et eIF5 sont ensuite libérés, la sous unité 60S du ribosome est alors recrutée permettant le démarrage de l'étape d'élongation de la traduction.



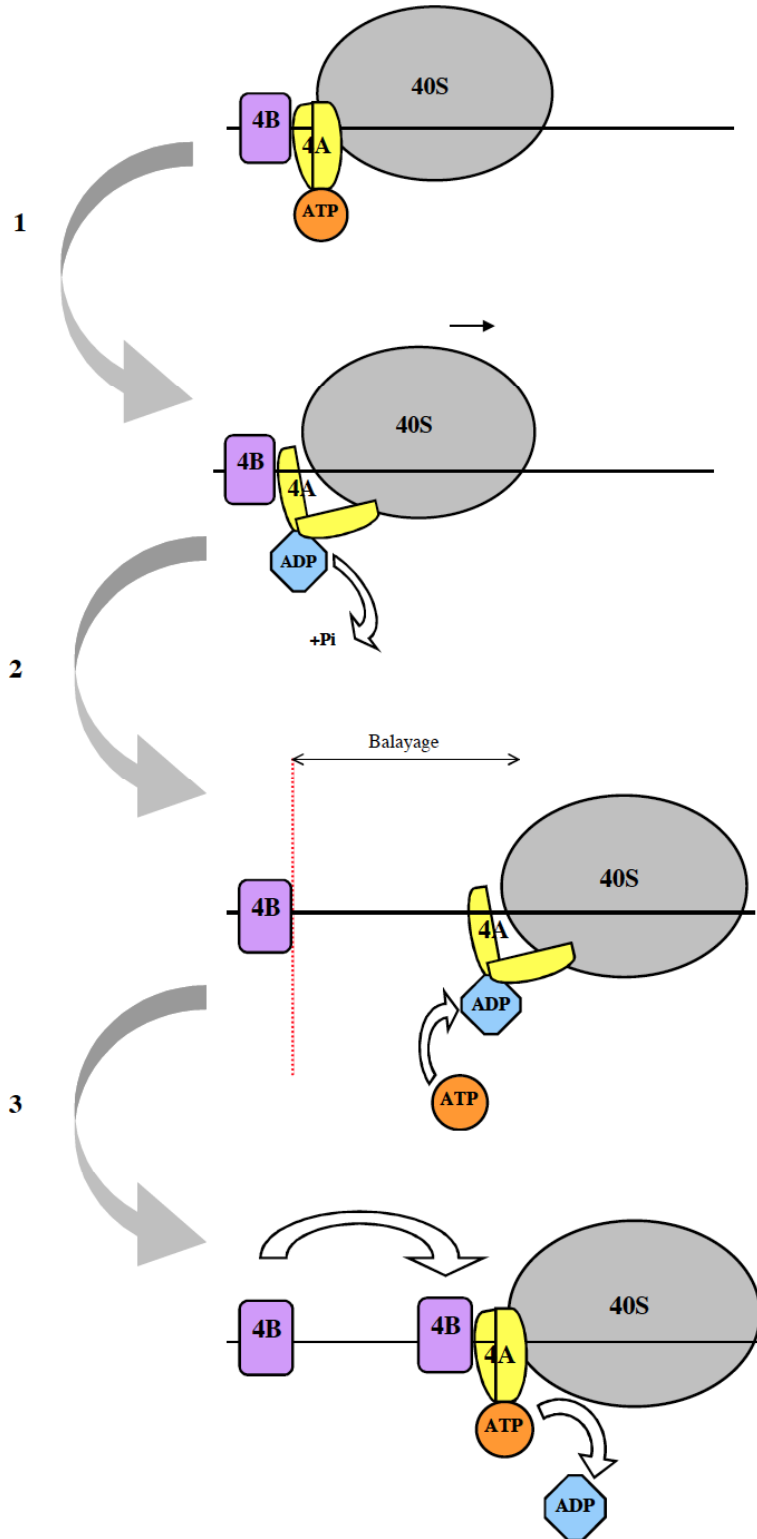
Deux modèles de « balayage » sont proposés à l'heure actuelle : dans le premier modèle, le complexe eIF4F et le facteur eIF4B seraient disposés du côté 5' en amont du ribosome pour déstructurer l'ARN et aider le PIC à balayer la partie non codante (Figure 8) (Spirin, 2009). Lors de l'hydrolyse de l'ATP, eIF4A perdrait son affinité pour l'ARN en se retrouvant sous une conformation ouverte. Cela permettrait à la sous-unité 40S de se déplacer vers le 3', puis l'attachement d'une nouvelle molécule d'ATP sur eIF4A permettrait de fixer à nouveau le complexe sur l'ARN. Le facteur eIF4B, lui aussi fixé sur l'ARN, interviendrait d'une part comme « cran d'arrêt » pour empêcher tout mouvement du ribosome vers le 5' lorsqu'eIF4A est sous sa conformation ouverte ; et d'autre part, eIF4B stimulerait la conformation ouverte d'eIF4A en aidant à l'hydrolyse de l'ATP. Le « balayage » vers l'extrémité 3' est donc le résultat d'une suite d'hydrolyse d'ATP et de petits déplacements de la sous-unité 40S. Des expériences, montrant que les régions de l'ARN en 5' de la sous-unité 40S sont protégées de la digestion par des RNases alors que les régions en 3' ne le sont pas, vont dans le sens de ce modèle.

Dans le second modèle, le complexe eIF4F serait disposé autour du ribosome, et positionnerait eIF4A et eIF4B au site d'entrée de la sous-unité 40S du ribosome (Figure 9) (Marintchev et al., 2009). De manière semblable au modèle précédent, l'hydrolyse de l'ATP permettrait de défaire les structures d'ARN en aval de la sous-unité 40S avant l'entrée de l'ARN, favorisant le « balayage » de 5' en 3'. Là aussi, des éléments vont dans le sens de ce modèle : des expériences de SAXS sur une partie d'eIF4G en complexe avec eIF4A montrent une structure de forme très allongée qui serait capable de se positionner à la fois à l'entrée et à la sortie du ribosome (Marintchev et al., 2009).

Néanmoins, il n'est pas à exclure que ces deux modèles coexistent en même temps que d'autres mécanismes de « balayage » : à titre d'exemple, l'équivalent d'eIF4B chez la levure (Tif3) n'est pas nécessaire pour l'initiation de la traduction (Berthelot et al., 2004). De même, en levure ou chez les cellules de mammifères, la déplétion du facteur eIF4G (4G1 en cellules de mammifères) affecte, mais ne supprime pas l'initiation de la traduction (Park et al., 2011b; Ramirez-Valle et al., 2008). De fait, ces deux modèles pourraient correspondre aux mécanismes de traduction les plus répandus mais ne seraient pas exclusifs.

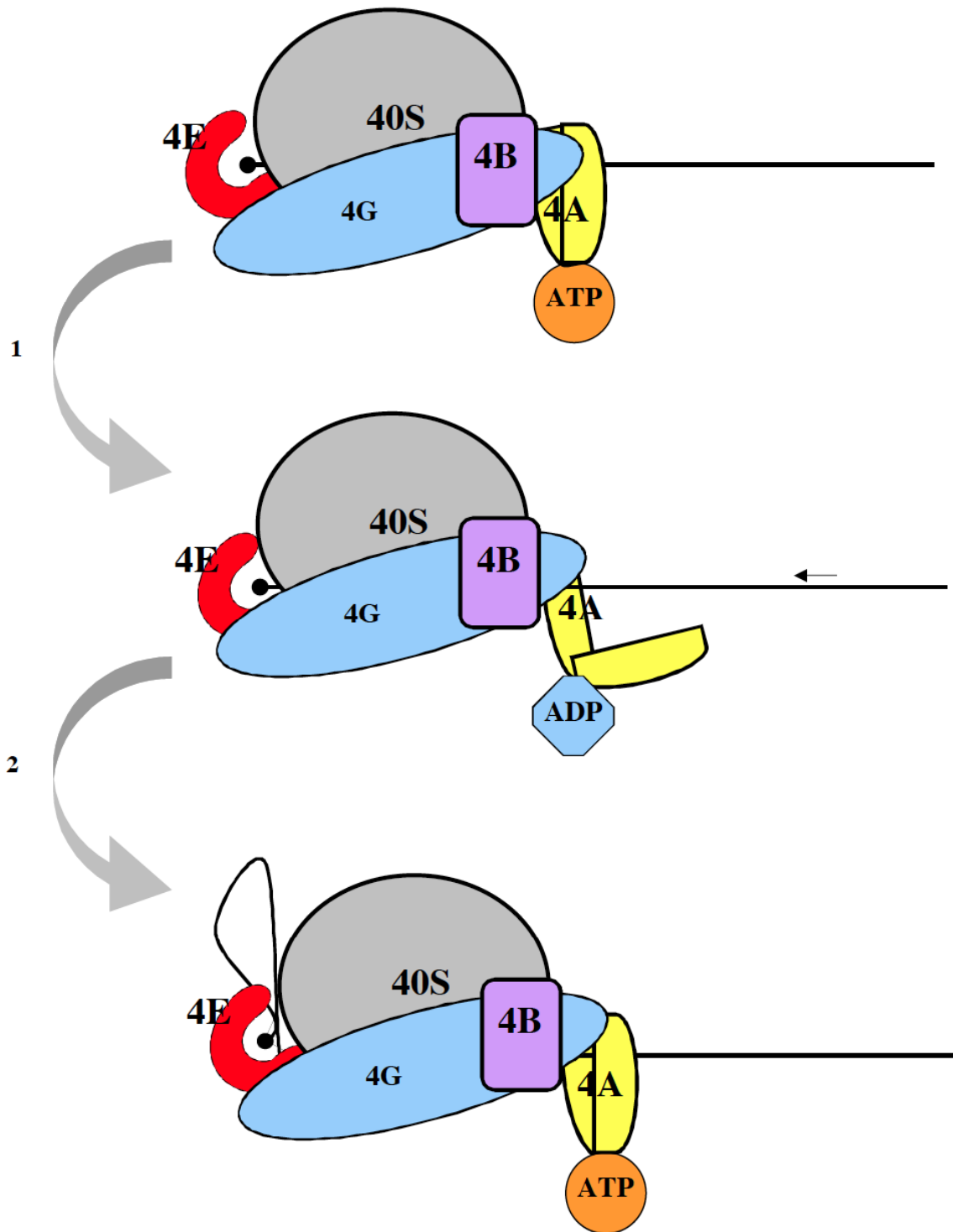
**Figure 8 : Modèle de balayage du complexe PIC (Modèle de Spirin).**

Ce modèle de balayage stipule qu'eIF4A se retrouve sous une conformation ouverte, suite à l'hydrolyse de l'ATP, permettant le déplacement du PIC le long de l'ARN. Le remplacement de l'ADP par l'ATP remet eIF4A sous une conformation fermée, et eIF4B est recruté au niveau de la nouvelle position du PIC, empêchant ce dernier de revenir en arrière lors du prochain cycle de balayage (Spirin, 2009).



**Figure 9 : Modèle de balayage du complexe PIC (Modèle de Marintchev).**

Contrairement au modèle de Spirin, le modèle de Marintchev postule qu'eIF4A et eIF4B seraient en avant du complexe PIC. L'hydrolyse de l'ATP permet alors l'ouverture d'eIF4A permettant au PIC de balayer l'ARNm. La position d'eIF4A et d'eIF4B devant le canal d'entrée du ribosome imposerait le balayage du 5' vers le 3'. La fixation d'une nouvelle molécule d'ATP remet eIF4A sous une conformation fermée (Marintchev et al., 2009).



### *b/ Contexte et reconnaissance de l'AUG*

Historiquement, ce sont les travaux de Marylin Kozak qui ont mis en évidence que la traduction des ARNm débute en général à partir du premier codon AUG, mettant en place les prémices du modèle du « balayage » de l'initiation de la traduction (Kozak, 1984). Par la suite, les travaux de Donahue *et al.* ont montré l'importance de l'interaction codon/anticodon entre l'ARNt<sup>i</sup> Met et le codon d'initiation chez la levure (Donahue and Cigan, 1988). En effet, l'expression d'un des gènes de la chaîne de synthèse de l'histidine dont le codon d'initiation AUG a été muté en codon AGG, peut être rétablie en surexprimant un ARNt<sup>i</sup> Met avec un anticodon UCC (au lieu de UAC). Ce résultat montre l'importance d'une interaction exacte entre codon de l'ARNm et anticodon de l'ARNt<sup>i</sup> Met pour initier la traduction. Il a cependant été noté que la traduction de certains ARNm ne débute pas à partir d'un codon d'initiation canonique AUG : à titre d'exemple, l'ARN codant DAP5, un homologue tronqué d'eIF4G1 ou 2, initie la traduction au niveau d'un codon GUG (Imataka et al., 1997).

Cet aspect a été complété par la suite par d'autres travaux de M.Kozak qui a mis en évidence l'importance des séquences autour du codon d'initiation et plus particulièrement le nucléotide en position -3 à partir de l'AUG qui, lorsqu'il est différent d'une adénosine ou d'une guanosine, réduit la fréquence d'initiation sur l'AUG correspondant (Kozak, 1986). De manière moins importante, les positions -2, -1 et +4 ont elles aussi un impact sur la fréquence d'initiation sur l'AUG correspondant. Aujourd'hui, différents facteurs d'initiation du complexe PIC sont proposés comme étant capables d'interagir avec ces positions pour stabiliser le complexe PIC lors de la reconnaissance du codon d'initiation (Pisarev et al., 2006).

Un travail de génétique en levure (Donahue, 2000) a permis d'obtenir différents mutants dits « Supressor of initiation codon mutant » ou mutants Sui<sup>-</sup> capable de rétablir l'expression de gène *his4* n'ayant pas le bon codon d'initiation (UUG au lieu de AUG) ni le bon anticodon ARNt<sup>i</sup> Met correspondant. Les mutations ont notamment pu être caractérisées sur trois facteurs : eIF2, eIF5 et eIF1. Dans un premier temps, ces travaux ont pu montrer que les mutants Sui<sup>-</sup> sur eIF2 ou eIF5 conduisaient à une hydrolyse accrue du GTP associé au facteur eIF2, permettant ainsi de réduire la stringence de la reconnaissance du codon d'initiation, et de ce fait, permettre l'initiation sur le codon muté UUG. Il a été montré pour les mutants Sui<sup>-</sup> du facteur eIF1, que c'est l'augmentation de la vitesse de dissociation du facteur eIF1 du complexe PIC qui facilite la reconnaissance du codon d'initiation (Cheung et al., 2007).

D'autres travaux ont de plus montrés que le facteur eIF1 a un rôle dans la discrimination des codons d'initiation trop proches de la coiffe en 5' (Pestova and Kolupaeva, 2002) même lorsque ceux-ci se trouvent dans un bon contexte d'initiation. Dans ce travail, les auteurs effectuent des

essais de traduction avec des ARN comportant une 5' UTR allant de 1 à 8nt, et observent une meilleure initiation à partir du codon d'initiation le plus proximal avec une 5' UTR longue. Néanmoins, même avec une 5' UTR de 8nt, il subsiste une initiation au second codon d'initiation signifiant que l'initiation au premier codon n'est pas optimale. Le fait qu'il y ait une longueur du 5' non codant minimale nécessaire pour avoir une bonne initiation s'explique certainement par le fait qu'il faut qu'une partie de l'ARNm passe dans tout le canal de la sous-unité 40S pour que le complexe en cours de « balayage » soit stable.

Le facteur eIF1A fait partie du complexe PIC mais n'était pas présent parmi les mutant Sui-. Des mutations, effectuées sur la partie C ou N terminale d'eIF1A, ont montré que ces domaines favorisent la conformation fermée ou ouverte du complexe d'initiation respectivement. Il a été proposé que la partie C terminale, éjectée du site P du ribosome suite à la reconnaissance du codon d'initiation, interagit avec eIF5 permettant la stabilisation de la conformation fermée du complexe PIC.

Aujourd'hui, ces différents travaux nous permettent de mieux comprendre comment s'agencent les différents facteurs. Le modèle proposé est que lors de l'interaction codon d'initiation / anticodon, l'encombrement stérique entre l'ARNti et eIF1 et eIF1A provoque des changements de conformation au niveau d'eIF1A et eIF5, conduisant à l'éjection du facteur eIF1 du complexe PIC. Ces différentes étapes permettraient à eIF5 d'induire l'hydrolyse du GTP d'eIF2. La libération du Pi du GTP d'eIF2 permet la séparation d'eIF2 d'avec l'ARNti, permettant à ce dernier de bien s'insérer dans le site P et d'interagir correctement avec le codon d'initiation. En parallèle, le changement de conformation de la partie C terminale d'eIF1A et de son interaction avec eIF5, conduit à la conformation fermée et stable du complexe PIC. C'est sous cette nouvelle conformation que les facteurs nécessaires, pour le recrutement de la sous-unité 60S et l'étape d'élongation, vont être enrôlés.

### **B/ Recrutement de la sous-unité 60S et élongation**

Lors de la reconnaissance du codon d'initiation, la sous-unité 40S du ribosome est associée aux facteurs eIF1A, eIF2, eIF5, eIF3 et à l'ARNti Met dans le site P, avec le deuxième codon dans le site A. La forme GDP d'eIF2 a une affinité faible pour l'ARNti Met (Kapp and Lorsch, 2004), et l'hydrolyse du GTP conduit à la séparation d'eIF2 du complexe d'initiation. De manière similaire, eIF5, qui est lié à eIF2 sous la forme GTP ou GDP, se dissocie du complexe (Algire et al., 2005; Singh et al., 2007), bien qu'il ne soit pas encore clair si la libération de ces deux facteurs de la sous-unité 40S est la conséquence de l'hydrolyse du GTP, ou si le recrutement de la sous-unité 60S par eIF5B intervient également. Suivant certains auteurs, le facteur eIF3 est alors lui aussi libéré de la



sous-unité 40S. Le facteur eIF1A est le seul facteur qui demeure associé à la sous-unité 40S du ribosome (Acker et al., 2009). C'est sa partie C terminale, une fois libérée d'eIF5, qui va permettre le recrutement d'eIF5B couplé au GTP, et associé à la sous-unité 60S du ribosome (Figure 7).

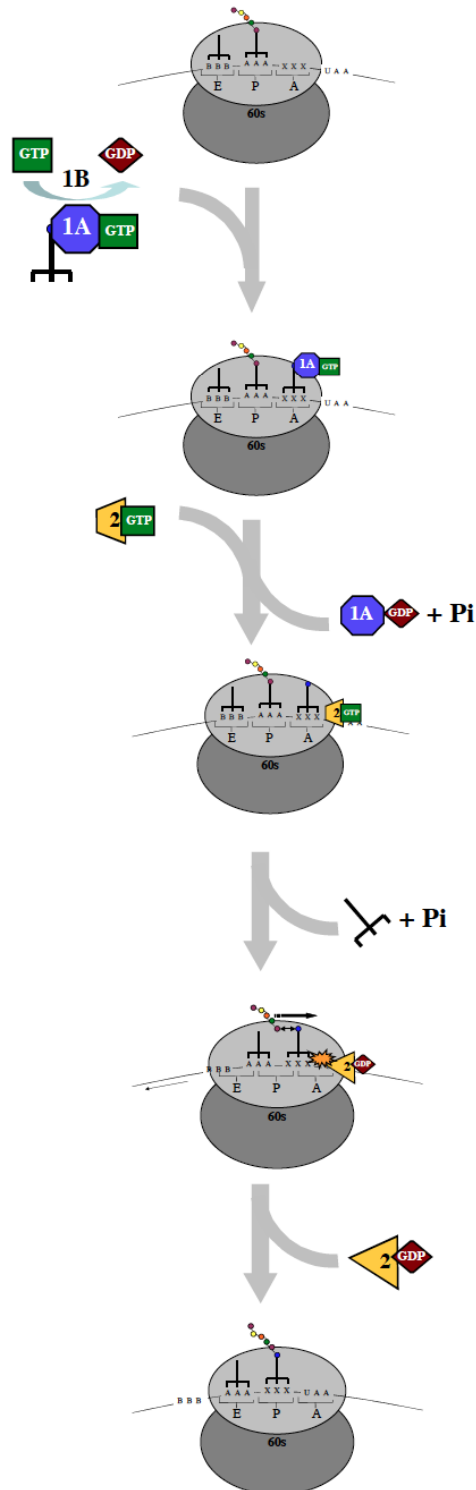
Le recrutement de la sous-unité 60S conduit à l'hydrolyse du GTP associé à eIF5B ce qui réduit l'affinité de ce facteur pour la sous-unité 60S. La séparation d'eIF5B de la sous-unité 60S induit un léger changement de conformation de cette dernière, ce qui amène eIF1A à se séparer à son tour du complexe 80S à présent formé (Acker et al., 2009).

Ainsi, eIF1A intervient à tous les niveaux de l'initiation de la traduction lors de la stabilisation de la conformation ouverte du PIC pour permettre l'étape de « balayage », le changement de conformation conduisant à la conformation fermée du PIC lors de la reconnaissance du codon d'initiation, puis au recrutement de la sous-unité 60S du ribosome.

A la fin de la phase d'initiation, l'ARNm est associé à un ribosome 80S avec l'ARNt<sub>i</sub> Met dans le site P, et le deuxième codon dans le site A. Commence alors la phase d'élongation (Figure 10). Le facteur d'élongation de la traduction eEF1A lie les ARNt aminoacylés de manière dépendante du GTP et les dirige au niveau du site A du ribosome. L'interaction codon/anticodon permet l'hydrolyse du GTP et la séparation du facteur eEF1A de l'ARNt. La liaison peptidique est établie ensuite dans le site P au niveau du centre peptidyl transférase. Cette réaction est catalysée par l'ARN ribosomique 28S lui-même, le ribosome est donc un rybozyme. Le facteur eEF2 couplé au GTP est recruté : l'hydrolyse du GTP conduit à un changement de conformation d'eEF2 permettant, d'une part, la translocation des ARNt et de l'ARNm, et, d'autre part, le relargage du facteur eEF2. Le GDP couplé à eEF1A est ensuite remplacé par du GTP via l'action d'eEF1B et l'opération se répète (au rythme d'environ deux acides aminés par seconde) jusqu'à atteindre un codon de terminaison.

**Figure 10 : Représentation schématique de l'élongation de la traduction.**

Les différents codons sont reconnus par les ARNt complémentaires combinés à eEF1A au niveau du site A du ribosome. Suite à l'hydrolyse du GTP, eEF1A est libéré de l'ARNt, et eEF2 est alors recruté. L'hydrolyse du GTP d'eEF2 va induire la formation de la liaison peptidique, et la translocation de l'ARNm et de l'ARNt à travers le ribosome. eEF2 est ensuite libéré et un nouveau cycle de reconnaissance de codon peut débuter.

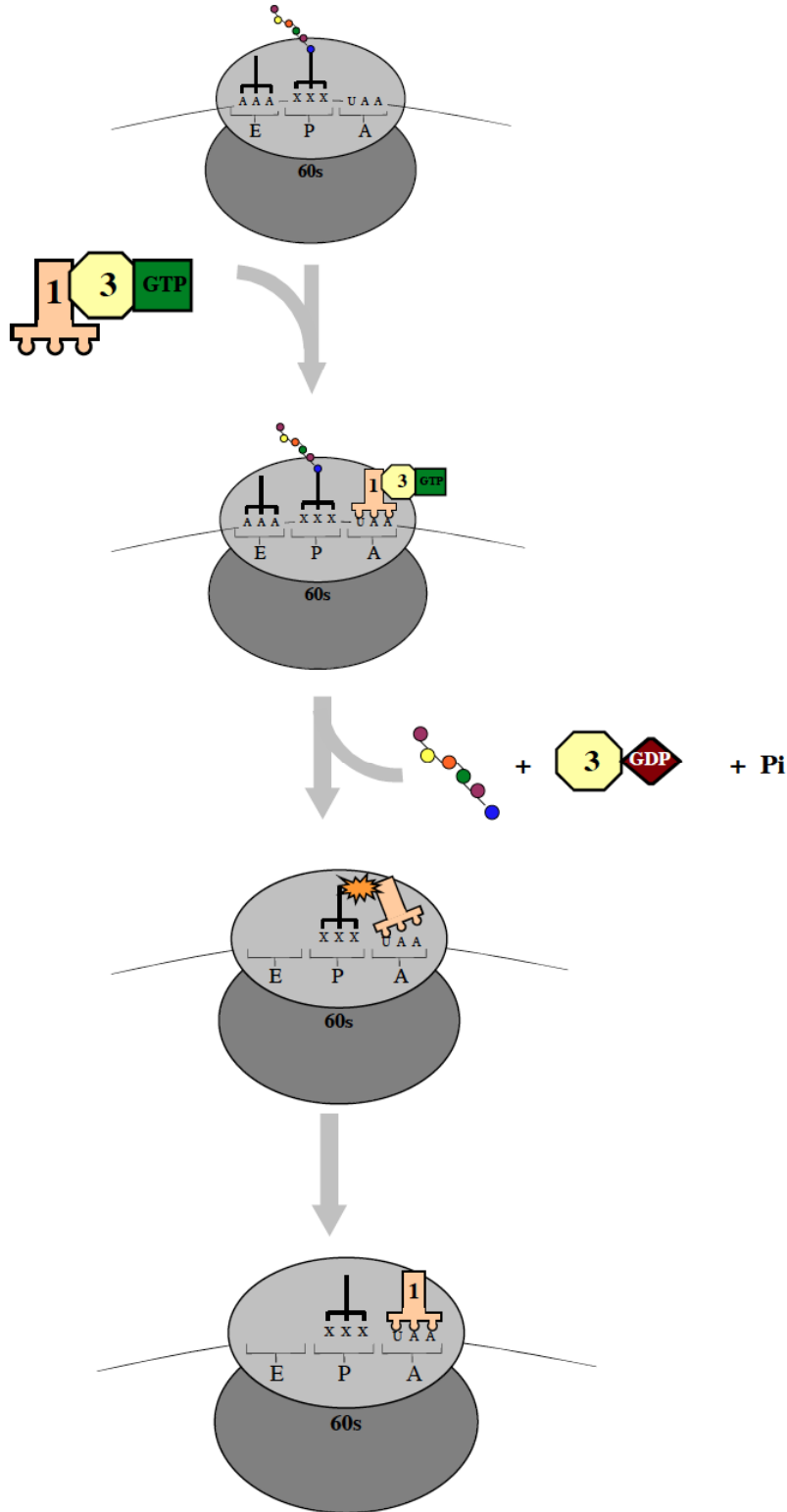


### C/ Terminaison de la traduction et recyclage des ribosomes

La terminaison s'effectue lors de la reconnaissance de l'un des trois codons de terminaison (UAA, UAG ou UGA) (Figure 11). Le facteur eRF1 est alors recruté au niveau du site A du ribosome par eRF3 couplé au GTP de manière similaire au recrutement du facteur eEF1A avec l'ARNt lors de l'étape d'élongation (Alkalaeva et al., 2006; Stansfield et al., 1995; Zhouravleva et al., 1995). Le facteur eRF1 est responsable de la reconnaissance du codon de terminaison : ce facteur, d'environ 49kDa, est une protéine mimant un ARNt (Song et al., 2000). Le domaine N terminal est responsable de la reconnaissance du codon de terminaison via une séquence NIKS, proposée comme étant impliquée pour interagir avec le codon (Chavatte et al., 2002). Un domaine centrale est similaire à la boucle acceptrice d'un ARNt, et se retrouve dans le centre peptidyl transférase du ribosome pour promouvoir la libération de la protéine néosynthétisée (Song et al., 2000). Enfin le domaine N terminal est impliqué dans l'interaction avec eRF3 (Cheng et al., 2009; Kononenko et al., 2008; Merkulova et al., 1999). Le facteur eRF3, d'environ 70kDa, possède un domaine N terminal relativement variable qui interagit avec la PABP et Upf1, ce dernier facteur étant impliqué dans la réponse Nosense Mediated Decay ou NMD (Cosson et al., 2002; Hoshino et al., 1999; Ivanov et al., 2008). La partie C terminale, plus conservée, est impliquée dans l'interaction avec le domaine central et le domaine C terminal d'eRF1. L'interaction d'eRF1 avec eRF3 permet d'améliorer l'efficacité de la terminaison de la traduction et la libération de la protéine néosynthétisée notamment via l'hydrolyse de son GTP (Alkalaeva et al., 2006; Eyler and Green, 2011). Ce complexe eRF1/eRF3+GTP est ensuite dirigé vers le site P du ribosome : l'interaction entre eRF1 et le codon de terminaison permet l'hydrolyse du GTP, ce qui provoque le placement du domaine central d'eRF1 dans le centre peptidyl transférase du ribosome (Frolova et al., 1996) puis, le détachement d'eRF3. Le recrutement d'une protéine ATPase de type ABC, le facteur ABCE1 ou Rli1 chez la levure, va permettre d'aider ensuite la libération du peptide de manière indépendante de l'ATP (Khoshnevis et al., 2010; Shoemaker and Green, 2011).

**Figure 11 : Représentation schématique de l'étape de terminaison de la traduction.**

De manière similaire à l'étape d'élongation, le codon de terminaison est reconnu au niveau du site A du ribosome par eRF1 couplé à eRF3 et au GTP. L'hydrolyse du GTP permet d'une part la libération du peptide néosynthétisé et d'autre part le relargage d'eRF3, laissant eRF1 dans le site A du ribosome.

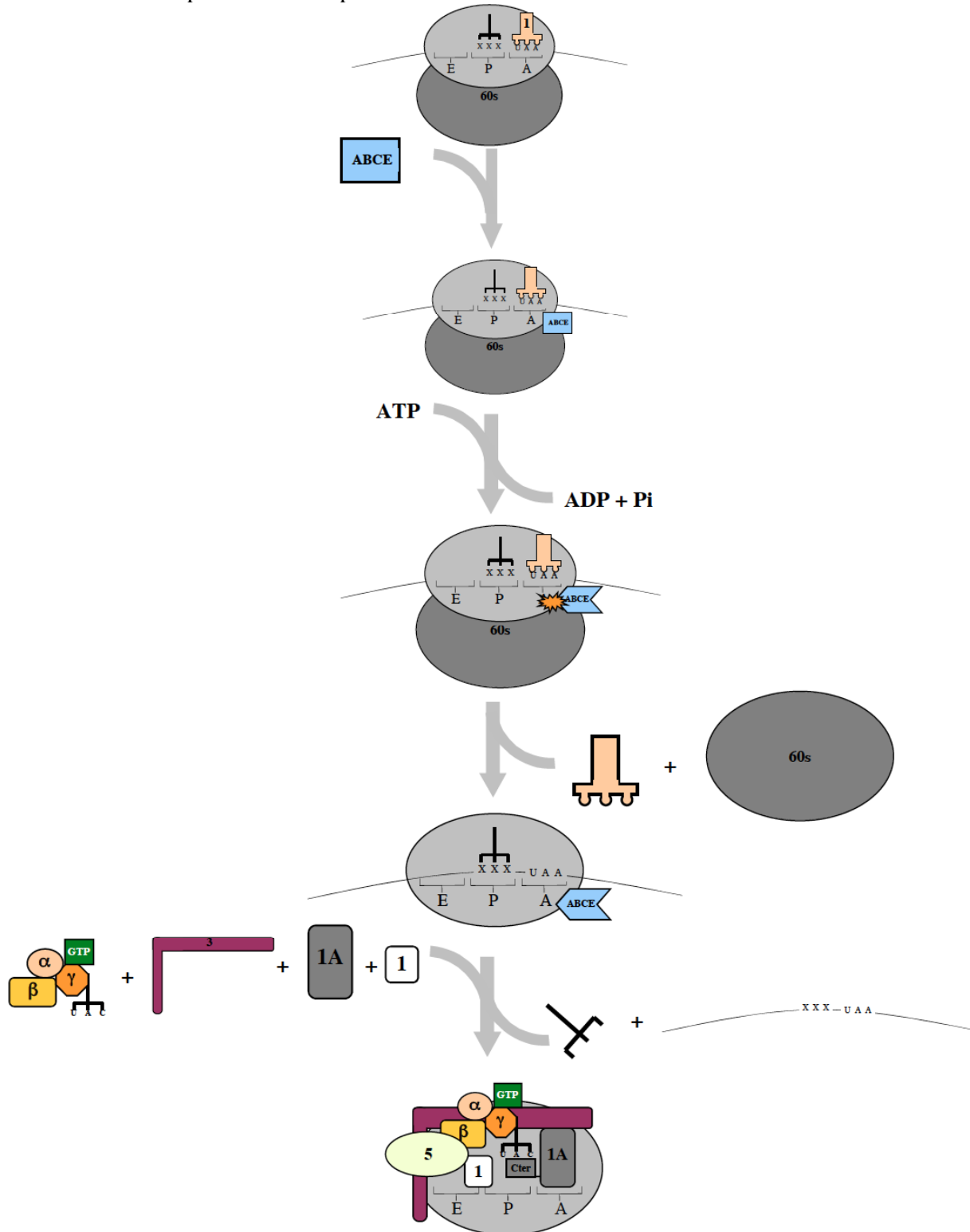


Une fois le peptide néosynthétisé libéré, le même facteur ABCE1, dont on suppose que l'activité ATPase permet de transformer l'énergie de l'ATP en contrainte mécanique, va permettre la dissociation des différents facteurs (Figure 12) (Pisarev et al., 2007a). Les sous-unités 40S et 60S, séparées par l'intervention d'eIF3, sont alors reprises en charge par leurs facteurs d'initiation de la traduction respectifs.

Dans le cas de la sous-unité 40S, la séparation de l'ARNt restant et de l'ARNm s'effectuerait via l'action de la ligatin (ou eIF2D) et de MCT-1/DENR (Dmitriev et al., 2010; Skabkin et al., 2010). Ces facteurs permettraient à la sous-unité 40S d'adopter à nouveau une conformation ouverte, ce qui conduit à sa dissociation de l'ARNm et l'ARNt. Il n'est pas encore bien défini si cette étape fait aussi intervenir les facteurs d'initiation de la traduction eIF1, eIF1A et eIF3 ou s'ils interviennent après la dissociation de l'ARNt et de l'ARNm (Pisarev et al., 2007a). La sous-unité 40S est de nouveau prête pour recevoir un complexe ternaire et réinitier la traduction. Concernant la sous-unité 60S, on ignore quels sont les mécanismes l'amenant à interagir avec eIF5B couplé au GTP.

**Figure 12 : Représentation schématique de l'étape de recyclage des sous-unités des ribosomes.**

Suite à la terminaison de la traduction, le facteur ABCE va permettre, grâce à l'hydrolyse d'ATP, la dissociation de la sous-unité 60S. Le ribosome est alors dissocié de l'ARNm. Puis, le recrutement des facteurs eIF3, eIF1 et eIF1A va permettre de conformer la sous-unité 40S sous une forme ouverte conduisant à la libération de l'ARNt et de l'ARNm encore présent. Le complexe ternaire est ensuite recruté au niveau de la sous-unité 40S donnant lieu à la formation d'un complexe PIC compétent.



### **III/ Voies de régulation de la traduction**

La traduction est une voie importante permettant à la cellule de produire les différentes protéines nécessaires à son bon fonctionnement. Il est estimé que ce processus central consomme 20% de l'ATP produit par la cellule (Buttgereit and Brand, 1995). C'est donc un processus qui nécessite une régulation fine, notamment au niveau de l'étape la plus limitante qu'est l'initiation de la traduction.

La cellule est soumise à différentes pressions environnementales qui conditionnent la régulation de la traduction. Les stress (choc thermique, radiation UV, infections virales), les signaux extracellulaires (hormones, facteurs de croissance, réponse à une infection) ou intracellulaires (ressources énergétiques, ressources en acides aminés disponibles) sont quelques unes des différentes conditions qui induisent l'augmentation ou la réduction globale de la traduction ou d'une catégorie particulière d'ARNm (Greenbaum et al., 2001).

La cellule a besoin de réagir rapidement et fortement à des stimuli, or la synthèse et la traduction des ARNm nécessitent du temps. De ce fait, il existe des gènes qui sont transcrits, mais dont les ARNm sont conservés sous un état silencieux pour être rapidement dirigés vers la traduction au moment où le stimulus survient. A l'inverse, il existe des conditions où la cellule va inhiber de manière plus globale la traduction. Pour cela, il existe des voies de régulation qui conduisent notamment vers des compartimentalisations cellulaires particulières (granule de stress, p-bodies), et permettent de rassembler les ARNm et différents facteurs pour induire leur dégradation et l'inhibition de la traduction.

Enfin, il existe un autre niveau de régulation de la traduction qu'est celui de la régulation par les microRNA (miRNA) : la cellule produit des petits ARN qui sont capables de s'hybrider sur des séquences cibles qui mènent soit à leur dégradation soit à l'inhibition de la traduction des ARNm cibles.

Ce sont principalement par des phases de phosphorylation/déphosphorylation que sont régulés les facteurs de traduction, principalement ceux impliqués dans l'initiation de la traduction. Différentes kinases sont impliquées, elles-mêmes régulées par d'autres facteurs activés ou inhibés par différents stimuli. Nous présenterons ces principaux acteurs impliqués dans la régulation de la traduction.

#### **A/ mTOR : facteur de régulation de l'initiation de la traduction.**

La protéine TOR pour « Target Of Rapamycin » est un facteur central, impliqué dans plusieurs voies de régulation cellulaire dont l'initiation de la traduction (Wullschleger et al., 2006).

C'est une Ser/Thr kinase existant sous forme de deux complexes protéiques fonctionnellement et structuralement différents : mTORC1 et mTORC2.

mTORC1 est le complexe impliqué dans la phosphorylation de différents facteurs d'initiation de la traduction (Caron et al., 2010; Zoncu et al., 2011) alors que mTORC2 semble plutôt impliqué dans l'organisation du cytosquelette et la survie cellulaire (Sarbasov et al., 2004; Sarbasov et al., 2005). mTORC2 semble aussi capable d'interagir avec les ribosomes pour phosphoryler les peptides néoformés afin qu'ils adoptent une conformation correcte (Oh et al., 2010; Zinzalla et al., 2011).

Une carence en acides aminés ou un excès d'oxygène sont des facteurs qui conduisent à l'inhibition de mTOR et à l'inhibition de la traduction, alors qu'à l'inverse, l'action d'hormone de croissance, ou l'apport de glucose sont des éléments stimulateurs de l'action de mTOR (Figure 13) (Zoncu et al., 2011).

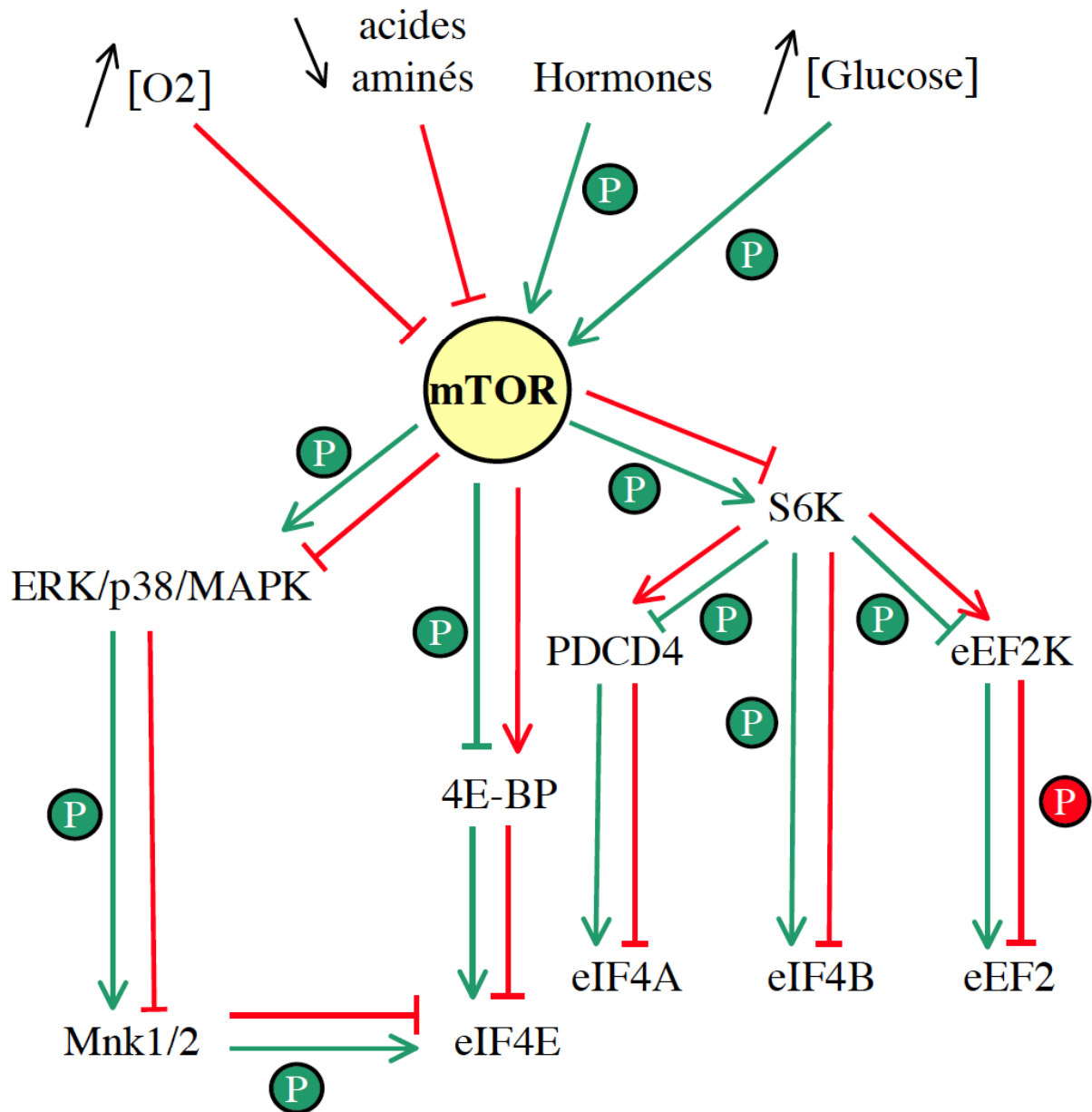
Lors d'une stimulation, comme l'activation de récepteurs tyrosines kinases par des hormones de croissance, mTOR est phosphorylé au niveau de son domaine kinase (Ser2159 et Thr2164 pour la mTOR humaine). Cette phosphorylation conduit à l'autophosphorylation de mTOR sur sa Ser2481 (Ekim et al., 2011). De plus, la phosphorylation au niveau de la Ser1261 stimule aussi son autophosphorylation au niveau de la Ser 2461 (Acosta-Jaquez et al., 2009) et l'activation de mTOR se traduit notamment par la phosphorylation d'un des cofacteurs du complexe mTORC1 (nommé raptor), conduisant à une stimulation accrue de la voie de signalisation mTOR (Foster et al., 2010).

Une fois le complexe mTORC1 activé, celui-ci induit sa voie de signalisation en phosphorylant différents substrats : parmi les substrats de mTOR impliqués dans la régulation de la traduction sont retrouvés la « eIF4E Binding Protein » ou 4E-BP, les kinases ribosomales S6 1 et 2, les MAPK-interacting kinase (Microtubule Associated Protéin kinase) ou Mnk (Buxade et al., 2008; Hay and Sonenberg, 2004).



**Figure 13 : La voie mTOR : une voie de régulation centrale de l'initiation de la traduction.**

Différents stimuli peuvent induire ou inhiber la voie mTOR. Cette voie repose principalement sur une cascade de phosphorylation de facteur conduisant ou non à l'activation de facteurs impliqués dans l'initiation de la traduction.



Stimulation ou inhibition de la traduction

(P) = Phosphorylation

### *1/ eIF4E et 4E-BP : un mécanisme de régulation des ARNm coiffés*

Le facteur 4E-BP est l'un des points de régulation de l'initiation de la traduction : ce facteur, d'environ 10kDa, dont il existe trois isoformes (4E-BP1, 2 et 3) est un compétiteur d'eIF4G pour la fixation d'eIF4E, empêchant ce dernier d'être recruté au niveau du complexe eIF4F. Lors de l'activation de mTOR, le facteur 4E-BP est phosphorylé sur les Thr37 et 46, puis sur les Ser65 et Thr70 ce qui conduit à sa dissociation avec eIF4E (Gingras et al., 1999; Gingras et al., 2001; Pause et al., 1994). Lors de l'inactivation de mTOR, le facteur 4E-BP est alors déphosphorylé par la Protéine Phosphatase 2A ou PP2A (Nho and Peterson, 2011).

Cependant, bien qu'eIF4E soit considéré comme le facteur le plus limitant dans l'initiation de la traduction (Sonenberg and Hinnebusch, 2009), aucune inhibition globale de la traduction n'est observée lorsqu'il est séquestré par le facteur 4E-BP (Colina et al., 2008; Dowling et al., 2010; Lynch et al., 2004; Petroulakis et al., 2009). Seul un certain groupe d'ARNm est fortement affecté : le groupe d'ARNm dit « eIF4E sensible » caractérisé par leur complexité structurale au niveau de la partie 5' non codante, alors que les ARNm dits « eIF4E insensibles » seraient peu structurés. Les ARNm « eIF4E sensibles » codent pour des gènes liés à la prolifération et à la survie cellulaire et ont été souvent caractérisés comme des oncogènes (Ex : Bcl-xl, cyclin, c-myc). A l'inverse, les ARNm dit « eIF4E insensibles » codent plutôt pour des gènes de ménages comme l'actine ou la tubuline (De Benedetti and Graff, 2004; Koromilas et al., 1992; Sonenberg, 2008; Svitkin et al., 2001).

eIF4E, une fois libéré du facteur 4E-BP, peut se fixer à eIF4G et être phosphorylé en position Ser209 par la kinase Mnk1 et 2. Les kinases Mnk 1 et 2 sont issues de deux gènes, chacun codant pour deux isoformes, et sont activées par la voie des kinases ERK et p38MAPK (Buxade et al., 2008). Une fois activée, Mnk interagit avec eIF4G via l'extrémité C terminale de celui-ci et induit la phosphorylation d'eIF4E (Pyronnet et al., 1999). Si cette phosphorylation d'eIF4E semble avoir un impact sur le développement chez la drosophile, aucun effet n'a pu être observé chez la souris. Par contre, il semble clair que cette phosphorylation joue un rôle important dans le caractère tumorigénique d'eIF4E (Furic et al., 2010; Lachance et al., 2002; Topisirovic et al., 2004; Ueda et al., 2004; Wendel et al., 2007).

### *2/ eIF4A et eIF4B : régulation de la traduction des ARNm structurés*

mTOR agit aussi sur la kinase S6 ribosomal (ou S6K), une kinase de la famille AGC qui comprend deux variants avec deux isoformes pour chacun d'entre eux chez les mammifères (Fenton and Gout, 2011). Lors de son activation par mTOR, S6K est phosphorylée au niveau des Thr229 et 389 ce qui lui permet alors de phosphoryler ses différents substrats comme la protéine ribosomale

rpS6, la protéine de programmation cellulaire 4 ou PDCD4 ou bien le facteur d'initiation de la traduction eIF4B (Banerjee et al., 1990; Dorrello et al., 2006; Fenton and Gout, 2011; Kozma et al., 1990; Raught et al., 2004).

PDCD4 lie le facteur d'initiation de la traduction eIF4A et entre en compétition avec le facteur eIF4G ; l'absence de l'hélicase au niveau du complexe eIF4F conduit à une inhibition de la traduction (Goke et al., 2002; Yang et al., 2004b) notamment des ARNm possédant une extrémité 5' UTR structurée comme cela a été présenté précédemment avec la régulation d'eIF4E. Sa phosphorylation par S6K sur les Ser67 et 457 conduit PDCD4 à être marqué par la dégradation par l'E3 ubiquitine ligase SCF (Dorrello et al., 2006).

Il a été montré qu'eIF4B stimule la traduction des ARNm codant des facteurs impliqués dans la survie et la prolifération cellulaires (par exemple XIAP, Cdc25 ou Bcl-2) et dont les extrémités 5' non codantes des ARNm sont fortement structurées (Shahbazian et al., 2010). S6K en phosphorylant eIF4B stimule son recrutement par eIF3 et donc favorise son interaction avec eIF4A dont il stimule l'activité hélicase ; ainsi la traduction des ARNm avec une extrémité 5' UTR structurée est favorisée (Holz et al., 2005; Shahbazian et al., 2006).

En conclusion, mTOR via S6K, agit au moins sur deux facteurs de l'initiation de la traduction modulant tous les deux la traduction d'ARNm en fonction de la structuration de leur région 5' non traduite. Parallèlement, S6K joue aussi au niveau de la stimulation de la traduction des ARNm épissés (Ma et al., 2008; Richardson et al., 2004) et au niveau de l'étape d'élongation de la traduction, et plus spécifiquement au niveau du facteur eEF2 (Wang et al., 2001).

### **B/ La sous-unité eIF2 $\alpha$ : une autre voie majeure de régulation**

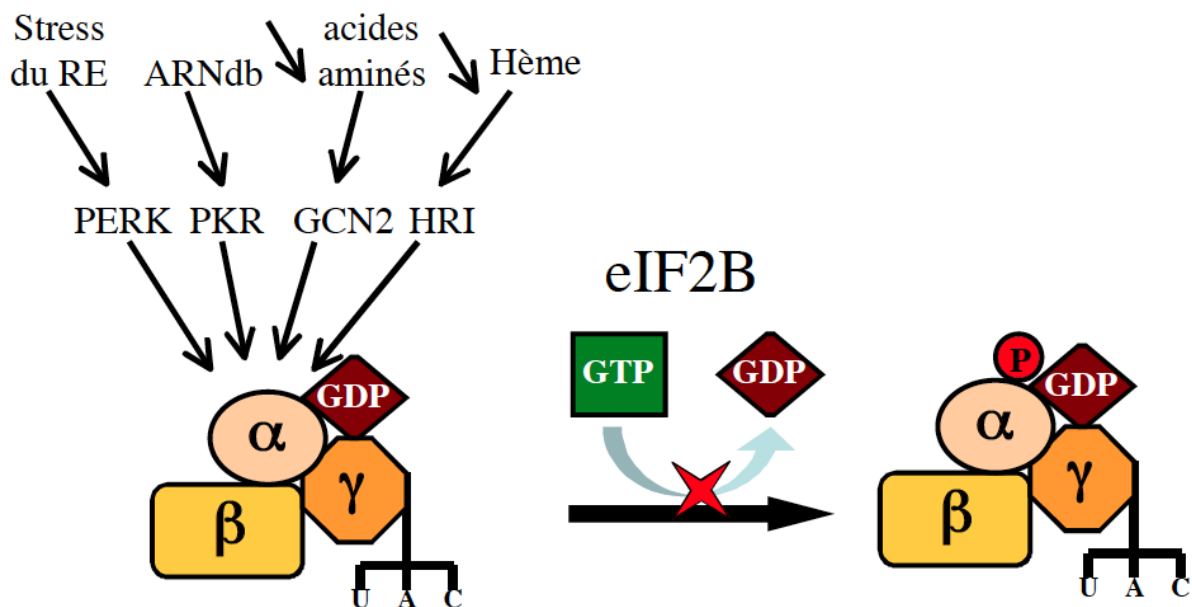
Une voie majeure de la régulation de la traduction implique le facteur eIF2 qui permet le recrutement de l'ARNt<sup>i</sup> Met au niveau du PIC et participe à la reconnaissance du codon d'initiation. L'hydrolyse du GTP lié à eIF2 est nécessaire au moment de la reconnaissance du codon d'initiation (Kapp and Lorsch, 2004; Pisarev et al., 2006). La phosphorylation de la sous-unité eIF2 $\alpha$  conduit eIF2 à interagir de façon irréversible avec eIF2B, responsable de l'échange du GDP par un GTP au niveau de la sous-unité  $\gamma$  d'eIF2. La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  va conduire à la séquestration d'eIF2 et ainsi bloquer l'initiation de la traduction (Dev et al., 2010; Hinnebusch et al., 2007; Krishnamoorthy et al., 2001).

Quatre kinases sont responsables de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (Figure 14) : la GCN2 pour « General Control Non-repressed 2 » est une kinase Ser et Thr qui s'active en fixant des ARNt déacylés, synonymes d'une carence en acides aminés (Dong et al., 2000). La kinase HRI ou « Heme

Regulated eIF2 $\alpha$  kinase » est activée dans le cadre d'une carence en hème : en condition normale, la HRI fixe l'hème qui inhibe son activation (Lu et al., 2001; Yun et al., 2005). La PERK ou « PKR-like ER Kinase » est activée lors du stress du reticulum endoplasmique : en absence de stress, la PERK est associée aux protéines chaperonnes du stress GRP78 et 94. Lors d'un stress, la présence de protéines mal structurées et/ou la dissociation des chaperonnes de la PERK conduisent à son activation (Bertolotti et al., 2000; Credle et al., 2005; Ma et al., 2002). Enfin, la PKR ou « Protein Kinase R » est une kinase, composée d'un domaine kinase et deux domaines de liaison aux ARN double brins, impliquée dans la réponse immunitaire innée. Lors de la reconnaissance d'ARN double brins qui peuvent être produits lors d'infections virales, les domaines de liaison à l'ARN se dissocient du domaine kinase, la PKR dimérise, s'autophosphoryle puis phosphoryle l'eIF2 $\alpha$  (Carpick et al., 1997; Green and Mathews, 1992; Manche et al., 1992; Nanduri et al., 2000; Schmedt et al., 1995; Sharp et al., 1998). Ainsi, de nombreuses infections virales, dont l'infection par le rotavirus (Montero et al., 2008), conduisent à la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et à l'arrêt des synthèses de protéines cellulaires.

**Figure 14 : eIF2 $\alpha$  : un autre facteur central dans la régulation de l'initiation de la traduction.**

Le complexe ternaire est la cible, notamment via sa sous-unité eIF2 $\alpha$ , de différentes kinases qui vont conduire à sa phosphorylation selon le stimulus adéquate. La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  empêche l'échange du GDP par une nouvelle molécule de GTP, nécessaire lors de la reconnaissance du codon d'initiation.



Les voies de régulation présentées ici ne sont que les exemples principaux de régulation d'initiation de la traduction parmi d'autres possibles et ne présentent qu'un aperçu de la complexité des mécanismes que la cellule déploie pour maintenir son homéostasie. Lors d'une infection virale,

ces voies de régulation constituent des obstacles à la multiplication virale. Comme nous le verrons plus loin, dans de nombreux cas, les virus ont évolué et mis en place différentes stratégies pour contourner ces obstacles à leur profit.

### **IV/ La traduction virale : voies d'initiation de la traduction non conventionnelles**

Compte tenu de la taille généralement réduite de leur génome, les virus ne peuvent coder l'ensemble des facteurs (protéines ou nucléiques) nécessaires à la traduction de leurs ARN messagers. Ainsi, si les virus peuvent être autonomes pour la synthèse de leur matériel génétique, ils sont totalement dépendants de la cellule pour la synthèse de leurs protéines (c'est même une des dernières barrières permettant de distinguer un virus d'une bactérie). La sélection naturelle a donc fait émerger plusieurs stratagèmes viraux permettant de détourner au profit des virus un ou plusieurs facteurs impliqués dans la machinerie de traduction cellulaire, et/ou de bloquer la traduction des ARN cellulaires. Cette partie est dédiée à la présentation de différentes stratégies et aspects de traduction mis en place lors d'infection par différents virus.

#### **A/ Ciblage du complexe eIF4F**

L'initiation est une étape clé de la traduction d'un ARNm et c'est la phase la plus compétitive. Il est donc naturel pour les virus de cibler, directement ou indirectement, certains facteurs clés de cette étape pour induire la traduction des ARNm viraux et/ou pour inhiber la traduction des ARNm cellulaires.

La coiffe et le complexe eIF4F (associant les facteurs eIF4G, eIF4E, eIF4A) responsable du recrutement de l'ARNm et de la sous-unité 40S du ribosome, font partie des cibles privilégiées lors d'une infection virale. La PABP, qui est associée à eIF4G pour la pseudo-circularisation des ARN, le complexe 43S (comprenant la sous-unité 40S du ribosome, d'eIF3, eIF2, eIF5, eIF1 et eIF1A) sont aussi ciblés.

#### **1/ Coiffe et eIF4E**

La traduction des ARNm cellulaires étant en très grande majorité dépendante de la présence d'une coiffe en 5' des ARNm, l'une des premières stratégies virales est d'empêcher la traduction des ARNm cellulaires en inhibant la traduction dépendante de la coiffe : la cible principale dans ce cas de figure est donc tout naturellement le facteur eIF4E. De plus, si certains virus ont su mettre en place une coiffe à l'extrémité 5' de leurs ARNm, beaucoup de virus sont démunis de coiffe sur leurs ARN et ont mis en place d'autres stratagèmes pour induire la traduction de leurs ARNm et/ou inhiber celle des ARNm cellulaires.

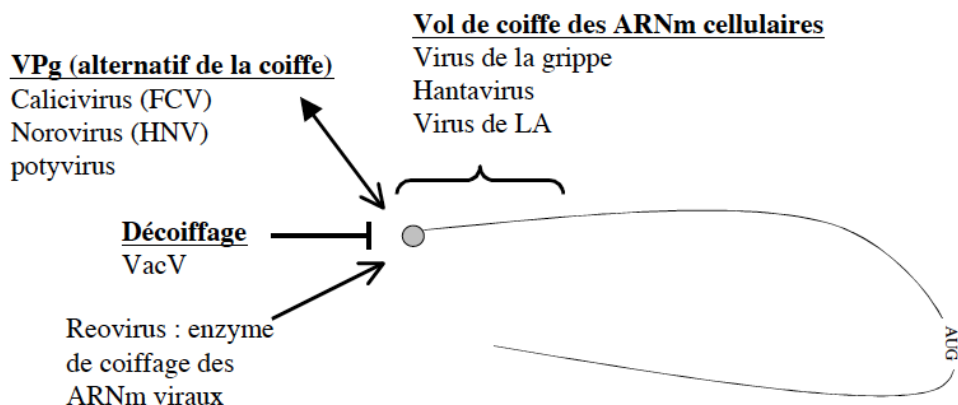
**a/ Décoiffage / vol de coiffe**

L'une des stratégies virales cible la coiffe directement afin d'induire une inhibition de la traduction des ARNm cellulaires : c'est la stratégie adoptée par les poxvirus et les asfarvirus qui tous deux codent une enzyme de décoiffage (VacV : protéines D9 et D10) induisant le retrait du m<sup>7</sup>GTP en 5' des ARNm cellulaires mais aussi des ARN viraux : ce mécanisme permettrait à ces virus de réguler l'expression de leurs gènes au cours du cycle (Parrish and Moss, 2007; Parrish et al., 2007). De manière similaire, les virus de la grippe, les hantavirus, et le virus LA de levure « volent » les 10-18 premiers nucléotides en 5' des ARNm cellulaires, comprenant notamment la coiffe, et les utilisent comme amorces pour synthétiser leurs propres ARNm (Dias et al., 2009; Fujimura and Esteban, 2011; Mir et al., 2008; Plotch et al., 1981; Reguera et al., 2010). Ce vol de coiffe est un mécanisme permettant à la fois la synthèse d'ARN viraux coiffés et le blocage de la traduction des ARNm cellulaires (Figure 15 et Tableau 2).

Les calicivirus, comprenant les norovirus, mais aussi les potyvirus (virus de plantes) codent une protéine, Viral Protein genome-linked ou VPg, liée de manière covalente au 5' de l'ARNm viral (non coiffé) et qui permet le recrutement d'eIF4F (via eIF4E ou eIF3) (Figure 15) (Daughenbaugh et al., 2006; Goodfellow et al., 2005; Khan et al., 2008). De manière similaire, la protéine VPg du virus de la pomme de terre A (genre potyvirus) protège les ARNm viraux de la dégradation et favorise leur traduction en se comportant comme une coiffe. Il a d'ailleurs été montré que des protéines VPg libres des potyvirus séquestrent les facteurs de traduction de l'hôte, notamment eIF4E, ce qui aiderait à inhiber la traduction cellulaire (Eskelin et al., 2011).

**Figure 15 : Stratégies de détournement de la traduction par les virus par ciblage de la coiffe.**

La synthèse d'ARNm viraux coiffés par des protéines virales, le vol des coiffes des ARNm cellulaires, des facteurs alternatifs à la coiffe (VPg) ou le décoiffage des ARNm sont différentes stratégies appliquées par les virus.



**Tableau 2 : Les différentes stratégies appliquées par les virus pour cibler le complexe eIF4F.**

**VacV** : Vaccinia Virus ; **VSV** : Vesicular Stomatidis Virus ; **SV40** : Simian Virus 40 ; **EMCV** : Encephalomyocarditis Virus ; **HAV** : Hepatitis A Virus ; **HCMV** : Human cytomegalovirus ; **EBV** : Epstein Barr Virus ; **ASFV** : African Swine Fever Virus

Elément ciblé	Virus (Facteur viral)	Description
<b>Coiffe</b>	VacV (D9 et D10)	Induit le décoiffage des ARNm : inhibition de la traduction et régulation de l'expression des gènes viraux
	Virus de la grippe (polymérase) Hantavirus (protéine N) Virus de LA (protéine gag et pol)	Vol de coiffe des ARNm cellulaires et transcription des ARNm viraux à partir de celles-ci
	Reovirus (protéine $\mu$ NS) Rotavirus (protéine VP3)	Facteur viral permettant le coiffage des ARNm viraux
<b>eIF4E</b>	Calicivirus, Norovirus, Potyvirus (Protéine VPg)	Facteur alternatif à la coiffe, permet le recrutement d'eIF4E.
	Virus de la grippe	Empêche la phosphorylation du facteur eIF4E (Mécanisme inconnu)
	Adenovirus (protéine 100K)	Empêche la phosphorylation du facteur eIF4E en évinçant MNK de eIF4G
<b>4E-BP</b>	VSV (Protéine M) SV40 (petit antigène T) EMCV HAV	Déphosphorylation du facteur 4E-BP (séquestre eIF4E; diminue la traduction cellulaire)
	Herpesvirus (Ex: HSV-1, US3) HCMV (UL38) EBV (LMP2A) VacV ASFV	Phosphorylation du facteur 4E-BP (Via la voie mTOR); libère eIF4E et stimule la traduction cellulaire ?

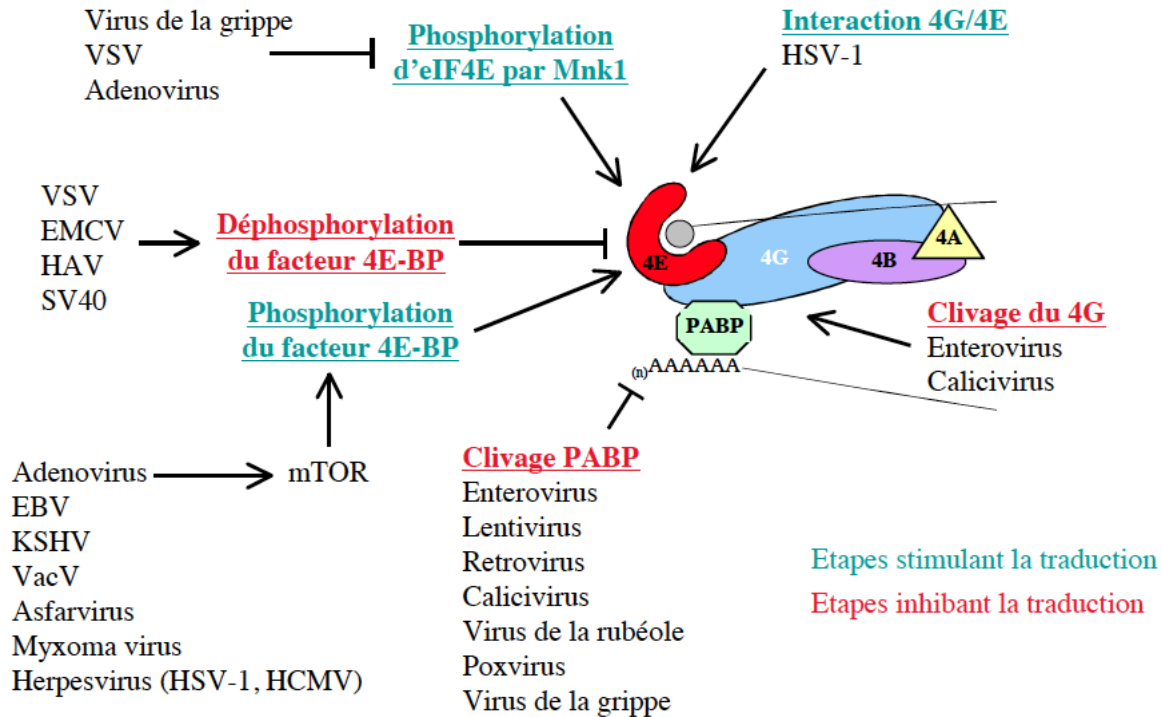
#### *b/ Ciblage du facteur eIF4E*

Il existe différentes stratégies virales pour empêcher l'action du facteur eIF4E soit directement (induction/inhibition de sa phosphorylation) soit indirectement (induction/inhibition par phosphorylation de son inhibiteur 4E-BP) (Figure 16, Tableau 2).



**Figure 16 : Stratégies virales ciblant eIF4F via les facteurs eIF4E et eIF4G.**

L'activation d'eIF4E directe ou indirecte via le facteur 4E-BP, le clivage d'eIF4G ou de la PABP sont différentes stratégies permettant le détournement ou la régulation des machineries de traduction. Dans certains cas, comme le clivage de la PABP, cela conduit aussi à l'inhibition de la traduction virale favorisant l'étape de réplication du génome viral. **VSV** : Vesicular Stomatitis Virus ; **HSV-1** : Herpes simplex Virus 1 ; **EMCV** : Encephalomyocarditis virus ; **HAV** : Hepatitis A Virus ; **SV40** : Simian Virus 40 ; **EBV** : Epstein Barr Virus ; **KSHV** : Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ; **VacV** : Vaccinia Virus ; **HCMV** : Human Cytomegalovirus



### c/ Stratégie d'inactivation de la traduction dépendante du facteur eIF4E

Le virus de la grippe, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) et les adénovirus sont, par exemple, capables d'empêcher la phosphorylation d'eIF4E, qui aide à reconnaître la coiffe et à renforcer l'interaction entre eIF4F et l'ARNm (Connor and Lyles, 2002; Feigenblum and Schneider, 1993; Huang and Schneider, 1991). Alors que le mécanisme de déphosphorylation d'eIF4E par le virus de la grippe n'est pas connu, il a été montré que la protéine 100k de l'adénovirus interagit avec eIF4G, lors des phases tardives de l'infection, et empêche le recrutement de la kinase Mnk1 dont l'un des substrats est eIF4E (Cuesta et al., 2000b, 2004). Les ARNm viraux sont alors traduits via un mécanisme dit de « ribosome shunting » les dispensant du facteur eIF4E en leur permettant de recruter les ribosomes via une structure secondaire contenue dans leurs extrémités 5' (Yueh and Schneider, 1996, 2000).

Certains virus ciblent indirectement eIF4E en agissant sur le facteur 4E-BP qui est le régulateur de l'interaction eIF4E-eIF4G. Ainsi, la protéine M du VSV inhibe la kinase Akt responsable de la phosphorylation de 4E-BP (Connor and Lyles, 2002; Dunn and Connor, 2011). Le



facteur 4E-BP, sous forme hypophosphorylée, peut alors interagir avec eIF4E. Les virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) et de l'hépatite A (HAV) induisent aussi la déphosphorylation du facteur 4E-BP1 par un mécanisme qui reste indéterminé à ce jour (Gingras et al., 1996). Il a cependant été montré que la phosphatase PP2A était responsable de la déphosphorylation du facteur 4E-BP, on peut donc suggérer que les virus utilisent cette voie (Nho and Peterson, 2011). Le virus SV40 (polyomavirus) induit la déphosphorylation du facteur 4E-BP via le recrutement par le petit antigène T de la Protein Phosphatase 2A (PP2A) (Buchkovich et al., 2008; Yu et al., 2005).

Si l'inhibition d'eIF4E conduit à l'inhibition de la traduction des ARNm dépendante de la coiffe, elle permet simultanément de protéger le virus contre des réponses antivirales. Il a été montré que des cellules, déficientes pour les facteurs 4E-BP1 et 2, bloquent la réplication des virus ARN sensibles aux interférons. Ces résultats ont été reproduits chez des souris dont l'expression de 4E-BP 1 et 2 a été supprimée (Colina et al., 2008). De ce fait, supprimer la traduction cellulaire est non seulement bénéfique pour permettre le recrutement des facteurs de traduction pour les ARN viraux, mais aussi pour inhiber ou réduire les réponses antivirales cellulaires.

#### *d/ Stratégies d'activation du facteur eIF4E*

Les virus à ADN synthétisent des ARNm généralement équivalents à ceux de la cellule car ils sont produits par la machinerie de transcription cellulaire. Ainsi, contrairement à ce qui a été présenté précédemment, ce sont plutôt des mécanismes d'induction de la traduction des ARNm coiffés par activation d'eIF4E qui vont être mis en place, afin de favoriser la traduction des ARNm viraux, apparentés à des ARNm cellulaires.

Le facteur mTOR est activé par les Herpesvirus, l'HCMV, l'EBV, le VacV, et les asfarvirus ce qui conduit à la phosphorylation du facteur 4E-BP permettant la mobilisation du facteur eIF4E pour la traduction (Figure 16). Par exemple, la protéine E6 des papillomavirus inhibe le TSC (Tuberous Sclerosis Complex) et conduit à l'inactivation du facteur 4E-BP par phosphorylation dépendante de mTOR (Spangle and Munger, 2010). De manière similaire, le polyomavirus des cellules de Merkel, les adénovirus, l'EBV, l'herpesvirus du sarcome de kaposi (KSHV), le VacV, le virus responsable de la peste porcine africaine (ASFV) et les poxvirus myxoma codent tous un facteur capable d'interagir soit directement à mTOR soit avec l'un des facteurs liés à la voie mTOR (PI3K, Akt, TSC...)(Gingras and Sonenberg, 1997; Shuda et al., 2011; Werden et al., 2007). Dans le cas du KSHV, de l'EBV, du VacV et de l'ASFV, cette interaction conduit notamment à la phosphorylation du facteur 4E-BP (Castello et al., 2009; Moody et al., 2005; Sodhi et al., 2006; Walsh et al., 2008).

Les virus de l'herpex simplex de type 1 (HSV1) et le HCMV codent respectivement pour les protéines Us3, une sérine/thréonine kinase, et UL38. Us3 mime l'action du facteur cellulaire Akt en phosphorylant notamment le complexe TSC2 (Chuluunbaatar et al., 2010). UL38 inhibe TSC2 d'une façon n'impliquant pas de phénomènes de phosphorylations (Moorman et al., 2008). Parallèlement au fait que le facteur eIF4E soit libéré de 4E-BP, empêcher la phosphorylation d'eIF4E diminue fortement la réplication des virus HSV1, HCMV et VacV, et la substitution d'eIF4E, par une version non phosphorylable, réduit aussi la réplication d'HSV1 et de VacV (Kudchodkar et al., 2004; Walsh et al., 2008; Walsh and Mohr, 2004; Walsh et al., 2005; Zaborowska and Walsh, 2009).

## 2/ Ciblage d'eIF4G

Protéine d'échafaudage au sein du complexe eIF4F, le facteur eIF4G permet le rassemblement des facteurs eIF4E, eIF4A et de la PABP pour préparer l'ARNm au recrutement du complexe 43S par l'interaction entre eIF4G et eIF3. De fait, eIF4G est aussi une cible privilégiée (Tableau 3).

**Tableau 3 : Les différentes stratégies appliquées par les virus pour cibler le complexe eIF4F.**

<b>Elément ciblé</b>	<b>Virus (Facteur viral)</b>	<b>Description</b>
<b>eIF4G</b>	Virus de la grippe (PB2)	Interaction avec eIF4G, permet son recrutement au niveau des ARNm viraux
	Calicivirus, entérovirus, retrovirus	Clivage d'eIF4G : permet la séparation des domaines de liaison à l'eIF4E du domaine de liaison à la PABP
<b>PABP</b>	Enterovirus (protéase 3C et 2A) Lentivirus (protéase) Retrovirus (protéase) Calicivirus (protéase 3C-like)	Clivage de la PABP : peut conduire à une inhibition de la traduction, mais aussi permettre la transition de la traduction vers la réplication.
	HSV-1 (ICP27)	Interagit avec la PABP : favorise la réplication virale (mécanisme inconnu)
	Virus de la Rubéole (protéine de capsid)	Séquestre la PABP : inhibe la traduction cellulaire
	Poxvirus (petits ARN POLAD)	Supprime la traduction des ARN poly(A)

Dans le cas du virus de la grippe, l'interaction entre eIF4G et la sous-unité PB2 de la polymérase virale a été observée, permettant le recrutement d'eIF4G au niveau de l'ARNm viral (Burgui et al., 2007; Salvatore et al., 2002; Yanguez et al., 2012). Lors d'infection par HSV1, il a

été montré que la protéine virale ICP6 favorise l'interaction entre les facteurs eIF4G et eIF4E (Walsh and Mohr, 2006). Par la suite, des travaux ont démontré que la protéine ICP6 partage un petit domaine homologue à hsp27, une chaperonne cellulaire qui régule la formation du complexe eIF4F lors de stress cellulaires (Carper et al., 1997; Cuesta et al., 2000a).

Le clivage d'eIF4G via l'action de protéases virales est une caractéristique des entérovirus, rétrovirus et calicivirus. La séparation du domaine N terminal, interagissant avec eIF4E (et la PABP), de la partie C terminale qui interagit avec eIF3 et eIF4A (Alvarez et al., 2003; Gradi et al., 1998; Willcocks et al., 2004) ne conduit qu'à une inactivation partielle du facteur eIF4G : la traduction cellulaire étant dépendante de la coiffe est inhibée tandis que la partie C terminale restante d'eIF4G va être utilisée pour la traduction des ARN viraux présentant en 5' une structure secondaire se substituant à la coiffe (IRES ; qui seront présentés ultérieurement).

### 3/ Ciblage de la PolyA Binding Protein (PABP)

Une autre marque des ARNm cellulaires, en plus d'une coiffe en 5', est la présence d'une extrémité polyadénylée en 3'. La PABP constitue un autre facteur clé pour l'inhibition de la traduction des ARNm cellulaires et le détournement des facteurs de traduction (Tableau 3).

Par exemple, les entérovirus, les lentivirus, les rétrovirus et les calicivirus clivent la PABP, bien que ce clivage ne soit pas toujours corrélé avec une inhibition de la traduction cellulaire (Alvarez et al., 2006; Bonderoff et al., 2008; Kuyumcu-Martinez et al., 2004; Rodriguez Pulido et al., 2007; Zhang et al., 2007). En effet, dans certains cas, cela permet au virus d'induire la transition entre la traduction et la réplication des ARN : en clivant la PABP ou en inhibant l'interaction PABP-eIF4G, l'ARN viral, moins bien traduit, est alors orienté vers les étapes de réplication (Bradrick et al., 2007; Michel et al., 2001).

D'autres mécanismes montrent l'importance de la PABP lors d'infection virale.

Dans le cas du virus de la rubéole, la protéine de capsid interagit avec la partie C terminale de la PABP et inhibe la traduction cellulaire par séquestration du facteur cellulaire (Ilkow et al., 2008). A l'inverse, la protéine ICP27 d'HSV1 favorise la traduction des ARNm viraux en interagissant aussi avec la PABP (Ellison et al., 2005; Fontaine-Rodriguez and Knipe, 2008; Larralde et al., 2006).

Les poxvirus ont adopté une stratégie originale en synthétisant de petits ARN non codants polyadénylés (POLAD) qui supprimeraient la traduction des ARNm polyadénylés de l'hôte en interagissant avec la PABP (Cacoullos and Bablanian, 1991; Lu and Bablanian, 1996).

#### 4/ Cas particuliers non évoqués

Certains virus déploient des mécanismes plus globaux pour induire ou inhiber la traduction :

L'infection par le HCMV, par exemple, augmente la quantité des différents facteurs de traduction cellulaire. Ce mécanisme, dépendant de l'activation de mTOR, est induit via la protéine virale UL38 qui stimule la traduction des d'ARN codant les facteurs de traduction (McKinney et al., 2012; Perez et al., 2011; Walsh et al., 2005). La protéine virale UL69 de HCMV est responsable de l'export des ARNm viraux (Lischka et al., 2006) et peut interagir avec l'hélicase du complexe eIF4F, eIF4A, ainsi qu'avec la PABP. Il a été montré que cette interaction stimule la libération du facteur eIF4E de son répresseur 4E-BP (Aoyagi et al., 2010) mais le mécanisme expliquant ce phénomène reste inconnu.

Les mimivirus constituent un nouveau genre viral dont le génome contient de nombreux gènes s'apparentant à des facteurs de traduction, dont eIF4E. Néanmoins, leur éventuel impact lors de la traduction virale ou cellulaire n'a pas été défini (Arslan et al., 2011; Fischer et al., 2010).

Enfin, un mécanisme différent d'inhibition de la traduction cellulaire a été observé chez le coronavirus responsable du Syndrome Respiratoire Aiguë Sévère (SRAS) : la protéine virale Nsp1 s'associe avec la sous-unité 40S du ribosome et clive les ARNm cellulaires. La région non codante en 5' protège l'ARN ScoV de la dégradation permettant au virus de ne pas subir d'inhibition de la traduction via l'action de sa propre protéine Nsp1 (Huang et al., 2011; Kamitani et al., 2009; Kamitani et al., 2006).

#### B/ Ciblage du complexe 43S

La sous-unité 40S du ribosome est prise en charge par eIF3 afin d'être recrutée au niveau de l'ARNm via l'interaction entre eIF3 et eIF4G. Du fait de son importance pour le recrutement du ribosome, l'eIF3 constitue aussi une cible d'importance pour les virus.

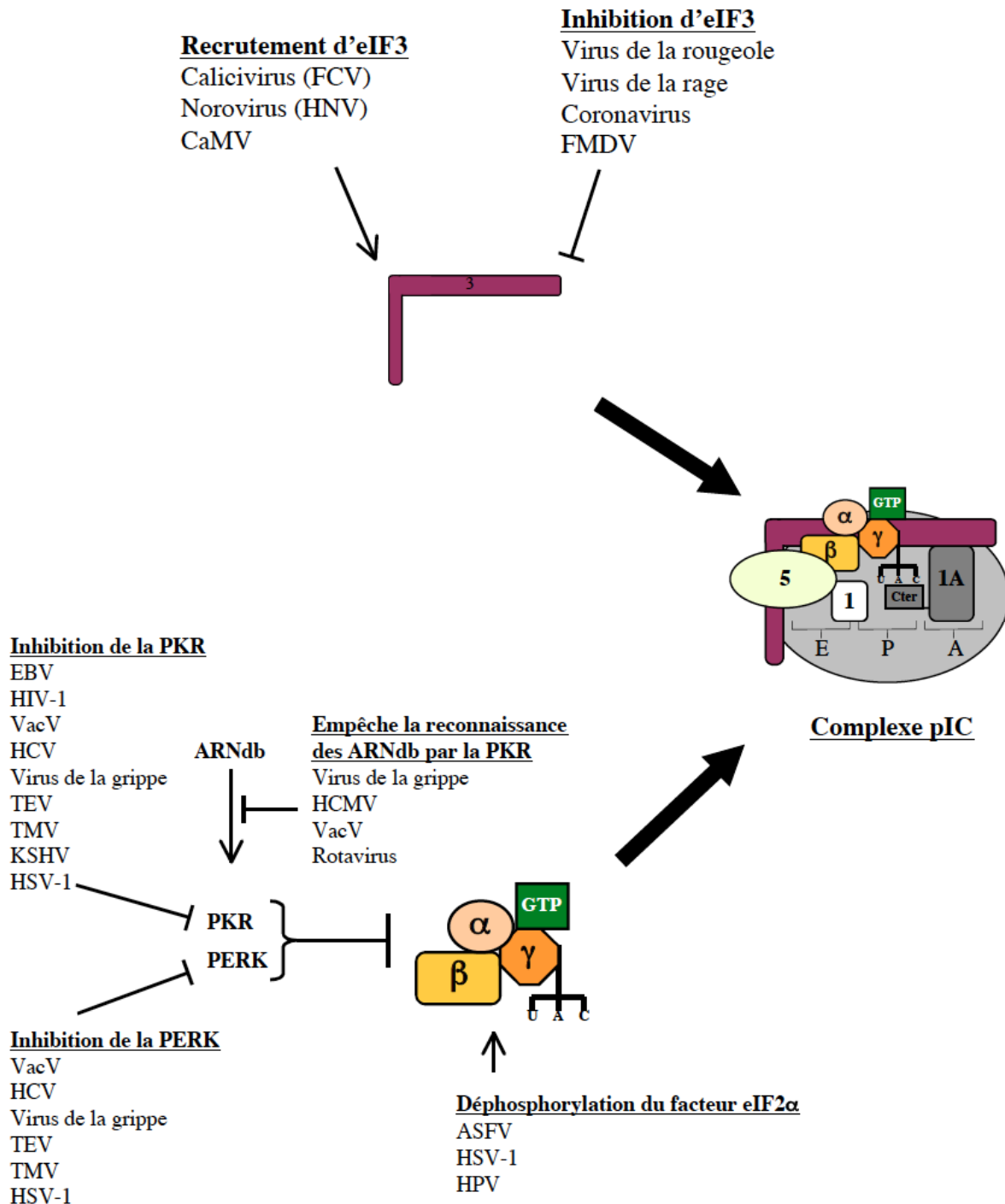
eIF2 est un autre facteur constituant le complexe 43S et permet notamment la reconnaissance du codon d'initiation par l'ARN<sup>t</sup> Met. Ce facteur a une importance capitale puisqu'il est régulé par 4 kinases cellulaires dont la PKR qui va répondre et induire la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  suite à la reconnaissance d'ARN double brins, souvent produits lors de la réplication de virus ARN.

#### 1/ Ciblage de l'eIF3

Comme précédemment, on peut distinguer des virus qui vont cibler eIF3 afin d'aider à la synthèse de leurs protéines, de ceux qui ciblent eIF3 pour empêcher la synthèse protéique cellulaire seulement (Figure 17, Tableau 4).

**Figure 17 : Stratégies virales ciblant le complexe PIC via eIF3 et le complexe ternaire (eIF2α).**

Le facteur eIF3 ou le complexe ternaire sont régulés afin de favoriser la traduction virale. L'état de phosphorylation du facteur eIF2α est notamment l'un des points majeurs de régulation. **CamV** : Cauliflower Mosaic Virus ; **FMDV** : Foot and Mouth Disease Virus ; **EBV** : Epstein Barr Virus ; **HIV-1** : Human Deficiency Virus ; **VacV** : Vaccinia Virus ; **HCV** : Hepatitis C Virus ; **TEV** : Tobacco Etch Virus ; **TMV** : Tobacco Mosaic Virus ; **KSHV** : Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ; **HSV-1** : Herpes Simplex Virus 1 ; **ASFV** : African Swine Fever Virus ; **HPV** : Human Papillomavirus



**Tableau 4 : Les différentes stratégies appliquées par les virus pour cibler le complexe PIC.**

**FCV** : Feline Calicivirus ; **HNV** : Human Norovirus ; **CaMV** : Cauliflower Mosaic Virus ; **FMDV** : Foot and Mouth Disease Virus

Elément ciblé	Virus (Facteur viral)	Description
<b>eIF3</b>	FCV (VPg) HNV (VPg)	Lie eIF3 et permet le recrutement des facteur d'initiation de la traduction
	CaMV	Lie les sous-unités a et c d'eIF3, la protéine L24 et la sous-unité 60S
	Virus de la rougeole (protéine de nucléocapside N) Virus de la rage (protéine de matrice M) Coronavirus (protéine de spicule S)	Lie eIF3 : induit l'inhibition de la traduction cellulaire
	FMDV	Dégradation des sous-unités a et b d'eIF3. Inhibe la traduction.

Le calicivirus Félin (FCV), le norovirus humain (HNV) ou le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) sont des exemples bien caractérisés. Dans une partie précédente, le FCV et le NHV ont été décrits comme ayant des ARN génomiques liés de manière covalente à une protéine VPg (Viral Protein genome-linked) en 5'. La VPg du FCV et du HNV interagit avec eIF3 et donc permet le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome (Daughenbaugh et al., 2003). Un mécanisme supplémentaire existe chez le FCV qui utilise une séquence de 87 nucléotides pour permettre la réinitiation de la traduction par des ribosomes ayant traduit l'ORF en amont de l'ARN polycistronique (Poyry et al., 2007).

Le cas du CaMV est similaire au FCV : celui-ci comprenant un ARNm polycistroniques. CaMV code une protéine virale TAV (transactivator viroplasmin) permettant la réinitiation des ribosomes : TAV lie eIF3 au niveau de la sous-unité g (au même site de liaison qu'eIF4B) et la protéine cellulaire RISP dite « de support de réinitiation ». En interagissant avec les sous-unités a et c d'eIF3, et la protéine ribosomale L24, RISP permet le recrutement de TAV au niveau des sous-unités 60S et 40S du ribosome. Enfin, il a été montré que TAV recrute aussi le complexe mTOR permettant, dans un premier temps, la phosphorylation de RISP, puis dans un second temps, induisant la réinitiation de la traduction et la réplication virales (Schepetilnikov et al., 2011).

Les virus de la rougeole et de la rage, et les coronavirus codent tous une protéine de liaison à eIF3 inhibant la synthèse des protéines cellulaires respectivement via la protéine N de nucléocapside, la protéine M de matrice et la protéine S de spicule (Komarova et al., 2007; Sato et al., 2007; Xiao et al., 2008). Cependant, le mécanisme exact responsable de l'inhibition n'est pas

clairement défini. Le virus responsable du syndrome pieds-mains-bouche (HFMDV) dégrade les sous-unités a et b d'eIF3, néanmoins, les facteurs impliqués dans ce clivage restent indéterminés (Rodriguez Pulido et al., 2007).

## 2/ Ciblage de l'eIF2

La sous-unité  $\alpha$  d'eIF2 est un point central de régulation, cible de quatre kinases cellulaires. Une première d'entre elles, la PKR, phosphoryle eIF2 $\alpha$  à la suite de la reconnaissance d'ARN double brins produits lors d'infections virales. La PERK est une autre kinase d'eIF2 $\alpha$ , proche de la PKR et présente dans la membrane du reticulum endoplasmique (RE). L'activation de la PERK par phosphorylation fait suite au stress du RE induit par l'accumulation de glycoprotéines mal repliées. L'infection virale pouvant être une source de stress cellulaire, la PERK constitue aussi une cible à réguler par les virus. Les virus ont donc, sous la pression de sélection, adopté et souvent combiné plusieurs stratégies afin d'outrepasser l'inhibition de la traduction par phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (Figure 17, Tableau 5).

**Tableau 5 : Les différentes stratégies appliquées par les virus pour cibler le complexe PIC.**

**EBV** : Eppstein Barr Virus ; **VacV** : Vaccinia Virus ; **HCV** : Hepatitis C Virus ; **TMV** : Tobacco Mosaic Virus ; **TEV** : Tobacco Etch Virus ; **KSHV** : Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ; **HSV-1** : Herpes Simplex Virus 1 ; **HCMV** : Human cytomegalovirus ; **ASFV** : African Swine Fever Virus ; **HPV** : Human Papillomavirus

Elément ciblé	Virus (Facteur viral)	Description
<b>eIF2 (PKR ou PERK)</b>	Adénovirus (ARNdb VA) EBV (ARN EBER)	Pseudo activateur de la PKR : bloque son activation.
	VacV (K3L) HCV (E2)	Pseudosubstrat de la PKR et de la PERK
	Virus de la grippe TMV TEV	Recrute la protéine chaperon p58 <sup>IPK</sup> . Conduit à l'inhibition de la PKR et de la PERK
	KSHV (v-IRF2)	Lie et empêche l'activation de la PKR
	HSV-1 (US11) HSV-1 (gB)	Antagoniste de la PKR Antagoniste de la PERK
	HCV (NS5A et IRES) EBV (protéine SM)	Inhibe la PKR
<b>eIF2 (ARNdb)</b>	Virus de la grippe (NS1)	Lie les ARNdb
	HCMV (TRS1 et IRS1)	Lie les ARNdb et inhibe la PKR
	VacV (E3L)	Lie les ARNdb
	Rotavirus groupe A (VP2) Rotavirus groupe C (NSP3)	Lie les ARNdb
<b>eIF2</b>	ASFV (DP71L) HSV-1 (ICP34.5) HPV (E6)	Recrutement des phosphatases PP2A ou GADD34-PP1. Conduit à la déphosphorylation d'eIF2.



### *a/ Blocage des voies de régulation par les kinases*

L'une des premières stratégies adoptées pour empêcher la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  est le blocage des kinases PKR et PERK.

Les adénovirus, l'EBV et le HIV-1 codent respectivement pour des ARN double brins VA, EBERs et Transactivation Response (TAR) qui agissent comme substrats de la PKR mais ne conduisent pas à son activation (Gunnery et al., 1990; Mohr et al., 2007). Cependant, dans le cas du HIV-1, l'ARN TAR a aussi été caractérisé comme étant capable d'activer la PKR et pourrait constituer un mécanisme d'inhibition de la traduction virale pour favoriser l'étape de réplication (Maitra et al., 1994; Sanghvi and Steel, 2011). Un mécanisme similaire est observé chez le VacV et le virus de l'hépatite C (HCV) qui code respectivement les protéines K3L (Rothenburg et al., 2011; Seo et al., 2008) et E2 (Mohr et al., 2007; Pavio et al., 2003; Taylor et al., 1999) comme pseudo-substrat pour la PKR et la PERK.

Le virus de la grippe, le virus de la mosaïque du tabac et le virus de la gravure du tabac (TEV : Tobacco Etch Virus) recrutent la protéine chaperonne cellulaire p58<sup>IPK</sup> qui inhibe la dimérisation de la PKR, en interagissant avec sa région C terminale de liaison à l'ATP, et de la PERK empêchant donc la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (Bilgin et al., 2003; Goodman et al., 2009; Goodman et al., 2007; Yan et al., 2002a; Yan et al., 2002b). De manière similaire, le KSHV code pour une protéine (v-IRF2) qui lie et empêche l'activation de la PKR (Burysek and Pitha, 2001).

Le HSV-1 inhibe aussi la PKR et la PERK respectivement via ses protéines antagonistes US11 (Mulvey et al., 1999) et gB (Mulvey et al., 2007). Le HCV inhibe la PKR via sa protéine virale NS5A et son IRES (Gale et al., 1998; Gale and Foy, 2005; Vyas et al., 2003). Enfin l'EBV inhibe la PKR via sa protéine SM (Poppers et al., 2003), alors que l'oncogène viral LMP1 serait responsable de l'activation de la PERK. Le rôle de ces mécanismes antagonistes reste peu clair (Lee and Sugden, 2008).

### *b/ Stratégies alternatives contre l'activation de la PKR : empêcher l'interaction entre les ARNdb et la kinase*

L'activation de la PKR s'effectue en plusieurs étapes : en l'absence d'infection, la PKR est sous une forme monomérique et inactive. Lors de la reconnaissance d'ARN double brins, celle-ci change de conformation et se dimérise. Ce dimère peut alors s'activer en s'autophosphorylant puis inhibe la traduction en phosphorylant eIF2 $\alpha$ . Les virus ont mis en place plusieurs contre-mesures sur chacune de ces étapes d'activation.



### *c/ Activation par séquestration des ARN double brins*

La protéine NS1 du virus de la grippe est impliquée dans plusieurs voies de régulation des réponses antivirales de la cellule, et est capable, entre autre, de lier les ARN double brins et empêcher l'activation de la PKR (Li et al., 2006).

Des travaux récents ont montré que la protéine TRS1 du virus HCMV interagit simultanément avec les ARN double brins et la PKR (Bierle et al., 2013; Marshall et al., 2009).

De manière similaire, en plus d'inhiber l'activation de la PKR en lui fournissant la protéine K3L comme un pseudo substrat, le VacV lie les ARNds via sa protéine E3L (Chang et al., 1992; Davies et al., 1993; Rothenburg et al., 2011).

La protéine NSP3 de rotavirus de groupe C présente à son extrémité C terminale une courte séquence d'acides aminés présentant des propriétés de fixation des ARN double brins. Ce peptide est libéré lors de la traduction de NSP3pgC par un mécanisme similaire à la séquence T2A (Langland et al., 1994; Szymczak et al., 2004). En ce qui concerne les rotavirus de groupe A, ce rôle de masquage des ARN double brins serait rempli par la protéine structurale VP2 (Rojas et al., 2010).

### *d/ Ciblage de la sous-unité eIF2 $\alpha$*

Certains virus vont aussi cibler le facteur eIF2 $\alpha$  afin d'empêcher sa phosphorylation et/ou de provoquer sa déphosphorylation. C'est le cas de l'ASFV, du HSV1 et du papillomas virus humain (HPV) dont, respectivement, les protéines DP71L, ICP34.5 et E6 déphosphorylent eIF2 $\alpha$  en recrutant les phosphatases cellulaires PP2A ou GADD34-PP1 (He et al., 1997; Kazemi et al., 2004; Mulvey et al., 2003; Zhang et al., 2010).

### *e/ Voie de traduction indépendante du facteur eIF2*

Enfin, il existe une catégorie de virus dont la traduction des ARNm est tout simplement indépendante de la présence d'eIF2 et, en conséquence, insensible à l'inhibition de la traduction provoquée par la phosphorylation de sa sous-unité  $\alpha$ .

Ainsi, l'Alphavirus Sindbis peut induire la traduction de ces ARN, même lorsque le facteur eIF2 $\alpha$  est phosphorylé, via la présence d'une structure secondaire sur l'ARN tardif 26S et l'action du facteur eIF2A (Ventoso et al., 2006). Le virus de la peste porcine (CSFV) utilise des mécanismes de traduction dépendants d'un IRES et indépendants d'eIF2 quand ce dernier est phosphorylé. Dans ce cas-là, ce serait eIF5B avec eIF3 qui permettrait le recrutement de l'ARNti Met (Hellen, 2009; Pestova et al., 2008).

Un cas plus extrême est celui du virus de la paralysie du criquet (CrPV) qui, non seulement, n'a pas besoin du facteur eIF2, mais d'aucun facteur d'initiation de la traduction, cette

caractéristique étant due à son IRES qui est capable de se substituer à l'ensemble des facteurs d'initiation de la traduction (présenté ultérieurement). Le CrpV est donc insensible à la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ .

D'autres virus semblent présenter des cas d'insensibilité à la phosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$ . Il a été montré dans le cas de l'HCV que la traduction dans certaines conditions *in vitro* est indépendante du facteur eIF2 (Lancaster et al., 2006). *In vivo*, dans des conditions de stress, la traduction des ARNm du virus d'HCV, ainsi que pour le virus Sindbis, s'effectue via le facteur eIF2A, un facteur alternatif permettant le recrutement de l'ARNti Met au niveau de la sous unité 40s du ribosome (Kim et al., 2011). Néanmoins, il a été montré que l'HCV recrute le facteur eIF2 et l'ARNti Met (Robert et al., 2006), et bien que l'infection par HCV induise la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , le virus utilise d'autres systèmes pour empêcher l'inhibition de la traduction (Voir plus haut). Notamment, il a été suggéré que le virus empêcherait la phosphorylation d'eIF2 localement au niveau des sites de réplication du virus intracellulaire (O'Malley et al., 1989).

L'infection par le poliovirus conduit aussi à une phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  au cours du temps qui est corrélée avec une baisse de la synthèse protéique (O'Neill and Racaniello, 1989). *In vitro*, la traduction de l'ARN du poliovirus est sensible à la phosphorylation d'eIF2, alors qu'elle ne l'est pas lors de l'infection (Redondo et al., 2011; Welnowska et al., 2011; White et al., 2011). Le clivage du facteur eIF5B par la protéase 3C<sup>pro</sup> et l'action de protéase 2A sur eIF4G seraient impliqués dans le passage d'une traduction dépendante d'eIF2 à une traduction indépendante de l'état de phosphorylation d'eIF2 (de Breyne et al., 2008; Redondo et al., 2011; White et al., 2011).

Enfin, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  a été montrée lors d'infection par le rotavirus (Montero et al., 2008) et cette phosphorylation est dépendante de l'action de la PKR (Rojas et al., 2010). Il semble donc probable que les ARN double brins synthétisés durant l'infection soient détectés par la cellule via la PKR conduisant à la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Cependant, une question reste en suspens : comment s'effectue la traduction des ARNm de rotavirus en présence d'eIF2 $\alpha$  phosphorylé ?

### C/ Recrutement des facteurs d'initiations via des structures secondaires d'ARNm

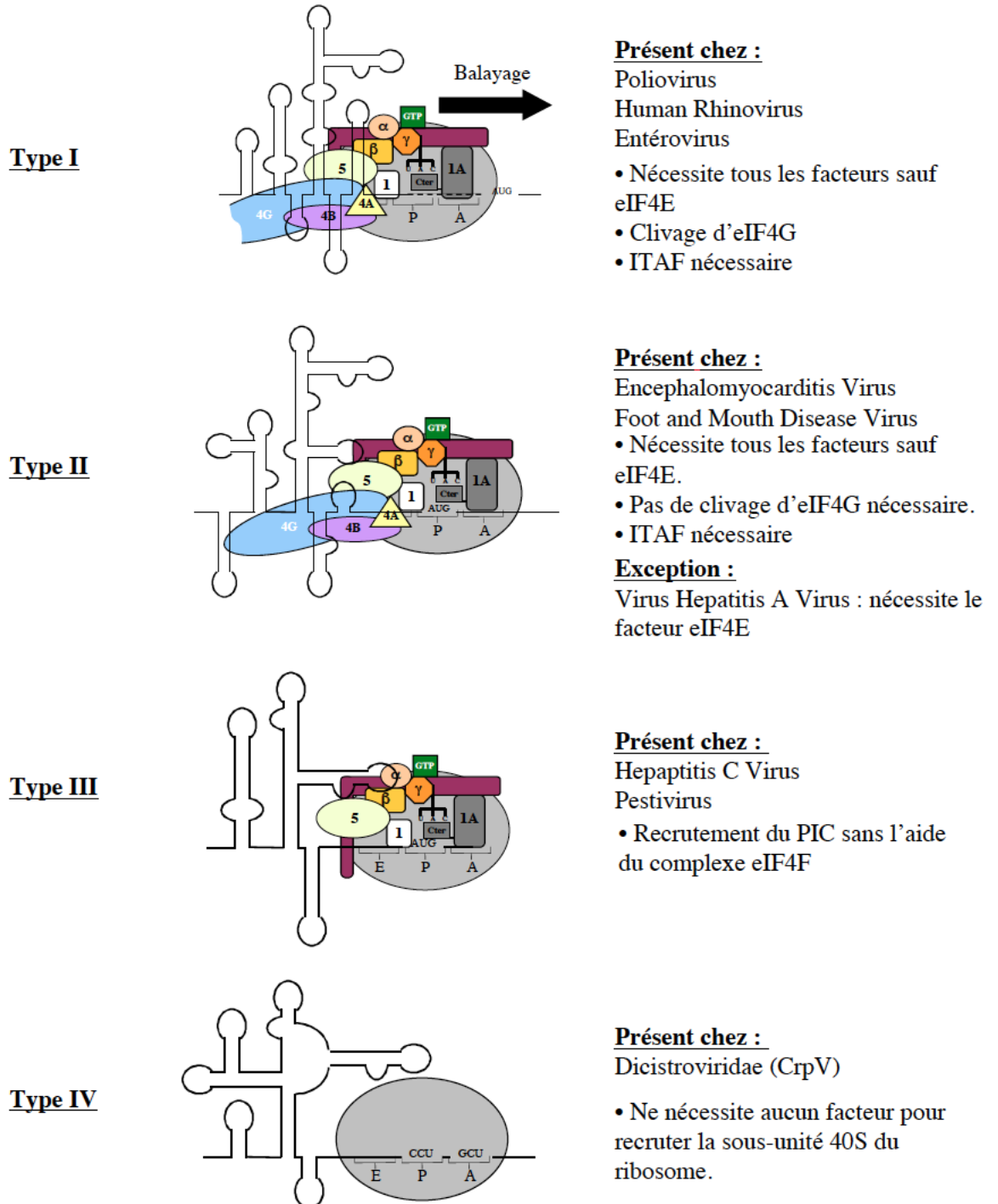
Il a été présenté précédemment des mécanismes qui utilisent principalement des interactions entre protéines virales et protéines cellulaires qui permettent le recrutement, ou des modifications post-traductionnelles ou des dégradations de facteurs cellulaires utiles à la traduction cellulaire mais pas à la traduction virale. Il existe une autre catégorie de mécanismes viraux utilisant des structures secondaires d'ARN pour recruter les facteurs d'initiations de la traduction. A titre d'exemple, les

potyvirus possèdent une structure en pseudo-noeud en 5' de leurs ARNm permettant le recrutement du facteur eIF4G (Gallie, 2001). Il existe d'autres catégories de structures secondaires d'ARNm, qui permettent le recrutement de certains facteurs d'initiation de la traduction.

Les « Internal Ribosome Entry Site » ou IRES sont des structures secondaires d'ARN permettant le recrutement des ribosomes et des facteurs d'initiation au codon d'initiation. Selon la structure de l'IRES, celle-ci permet l'interaction avec plus ou moins de facteurs d'initiation de la traduction voire une interaction directe avec les sous-unités du ribosome. La première caractérisation d'un IRES a été faite chez le poliovirus (Pelletier and Sonenberg, 1988; Trono et al., 1988a; Trono et al., 1988b), puis ensuite chez d'autres virus comme l'EMCV (Jang et al., 1988) avec une caractéristique équivalente à tous les IRES : la traduction sous contrôle d'un IRES est indépendante de la présence du facteur eIF4E. Actuellement, on distingue quatre à cinq catégories d'IRES en fonction des homologies de séquences, de structures secondaires d'ARN et des facteurs de traduction nécessaires à leur bon fonctionnement (Figure 18).

**Figure 18 : Structures secondaires en 5' des ARNm viraux ou Internal Ribosome Entry Site (IRES).**

Les IRES de différents virus sont classés en fonction de leur dépendance à certains facteurs de traduction et selon leurs similarités de structures d'ARN.



### 1/ Les IRES de type I

Cette catégorie comprend par exemple les IRES du poliovirus (PV), du rhinovirus humain (HRV) et d'autres entérovirus. Cet IRES nécessite tous les facteurs d'initiation à l'exception d'eIF4E. Durant l'infection par le poliovirus, eIF4G est clivé : la partie C terminale comprenant le domaine de fixation à eIF3 et à eIF4A est recrutée ensuite via l'IRES (de Breyne et al., 2009; Kempf and Barton, 2008; Kolupaeva et al., 1998; Krausslich et al., 1987; Willcocks et al., 2011). Il s'agit là d'un système où le virus peut utiliser eIF4G pour induire sa traduction et, en parallèle, inhiber la traduction cellulaire. Il a été aussi montré que d'autres facteurs sont nécessaires pour initier la traduction à partir des ces IRES : les IRES trans-acting factor (ITAF) sont des facteurs cellulaires (PCBP1 et 2, PTB...) qui conforment structuralement l'IRES et améliorent le recrutement et la liaison avec les facteurs d'initiation (Kafasla et al., 2010; Kolupaeva et al., 1996; Sweeney et al., 2014; Yu et al., 2011).

### 2/ Les IRES de type II

Cette deuxième catégorie comprend par exemple les virus FMDV, EMCV et ne nécessite pas de clivage d'eIF4G. A la place, le répresseur 4E-BP est sous sa forme hypophosphorylée et séquestre eIF4E (Gingras et al., 1996). Ce type II est similaire aux IRES de type I puisqu'il nécessite tous les autres facteurs d'initiation de la traduction ainsi que les ITAFs (Kafasla et al., 2010; Kolupaeva et al., 1996; Yu et al., 2011).

Cependant, il existe une exception au sein de cette catégorie : bien que celui-ci comporte des homologies de séquences et de structures secondaires, l'IRES du virus de l'hépatite A (HAV) se différencie des IRES de son groupe par le fait qu'il nécessite le facteur eIF4E pour initier la traduction. eIF4E serait nécessaire pour induire un changement de conformation d'eIF4G nécessaire à une bonne interaction avec l'IRES (Ali et al., 2001; Borman et al., 2001).

Une catégorie d'IRES a été identifiée récemment chez l'Aichivirus, puis a ensuite été caractérisée chez d'autres membres des Kobuvirus, Salivirus, Paraturdivirus appartenant au genre des picornavirus. Ce type d'IRES possède quelques caractéristiques équivalentes aux IRES de type I et de type II. Cependant, il possède aussi, comme spécificité, le besoin de l'action de l'hélicase de type DExH-box DHX29 afin d'exposer le codon d'initiation contenu au sein d'une structure stable en épingle à cheveux (Sweeney et al., 2011; Yu et al., 2011).

### 3/ Les IRES de type III

Cette troisième catégorie comprend l'HCV et les IRES des pestivirus. Ce type d'IRES ne nécessite que des facteurs eIF3, eIF2, eIF5B et de l'ARN<sup>ti</sup> Met pour positionner le ribosome : il

recrute le complexe 43S sans l'aide du complexe eIF4F (Babaylova et al., 2009; Berry et al., 2010; Locker et al., 2007). Il a été montré que la protéine ribosomale rps25 est nécessaire pour la traduction des ARNm sous dépendance de cet IRES bien que l'extinction de l'expression de cette protéine n'impacte pas la traduction cellulaire chez les mammifères ou la levure (Landry et al., 2009).

Enfin, il a aussi été observé que l'activité de l'IRES HCV est augmentée par la fixation du microARN mir122 ciblant la 5' UTR (Henke et al., 2008; Jangra et al., 2010; Jopling et al., 2008; Jopling et al., 2005) rendant l'impact des miRNA au sein de la traduction plus complexe à définir. Dans cette même étude, l'effet non inhibiteur du site de fixation de mir122 en partie 5' d'un ARN rapporteur a été reproduit, alors qu'un positionnement en 3' de ce même rapporteur rétablit l'inhibition de la traduction dépendante des miRNA habituellement observée.

D'autres IRES similaires ont été caractérisés mais nécessitant les autres facteurs d'initiation de la traduction. Chez le HIV-1 a été caractérisé un IRES dans la séquence codante de la protéine gag. Cet IRES interagit avec le facteur eIF3 et la sous unité 40S du ribosome. Dans cette étude, les auteurs proposent un modèle en deux étapes où le complexe 43S est recruté par l'IRES, puis les autres facteurs d'initiation de la traduction, exceptés eIF4E et eIF1, permettent le placement du ribosome au niveau du codon d'initiation (de Breyne et al., 2013; Locker et al., 2010). Enfin, le picornavirus simien de type 9 lie le facteur eIF3 et la sous unité 40S du ribosome, mais l'initiation s'opère mieux si le complexe eIF4F est présent (de Breyne et al., 2008).

#### 4/ Les IRES de type IV

Cette catégorie comprend la famille des dicistroviridae dont fait partie le virus de la paralysie du criquet (CrpV). Ce type d'IRES est caractérisé par le fait qu'il ne nécessite aucun facteur d'initiation de la traduction ni d'ARN<sup>ti</sup> Met (Cevallos and Sarnow, 2005; Jan and Sarnow, 2002; Kamoshita et al., 2009; Spahn et al., 2004; Wilson et al., 2000). Le recrutement des ribosomes s'effectue uniquement via l'interaction avec l'IRES et permet son positionnement au niveau d'un codon CCU non décodé dans le site P. L'initiation s'effectue ensuite au niveau d'un codon alanine positionné dans le site A après sa pseudotranslocation dans le site P du ribosome. Bien que cet IRES ne nécessite aucun facteur d'initiation, il a été montré que la protéine ribosomale rps25 est nécessaire pour une bonne initiation (Landry et al., 2009). De plus, la déficience de la pseudouridylation de l'ARN<sup>r</sup> réduit la liaison de la sous-unité 40S du ribosome au niveau de l'IRES et inhibe le démarrage de la traduction (Jack et al., 2011).

En conclusion, différentes structures secondaires d'ARNm permettant l'initiation de la traduction de manière non conventionnelle ont été décrites. Bien que différentes les unes des autres, le fonctionnement de ces structures secondaires repose sur le recrutement des facteurs d'initiation couplés à une perturbation des voies cellulaires conduisant ainsi à une synthèse protéique cellulaire diminuée pour une synthèse protéique virale efficace.

Les virus dispose ainsi d'un très grand nombre de moyen de dérégulation de la traduction cellulaire et de moyens pour récupérer les facteurs de traduction afin de favoriser leur réplication. Bien que nous l'ayons brièvement cité dans certains mécanismes de traduction virale, le cœur même de la traduction chez le rotavirus n'a pas été évoqué ; dans la partie suivante, nous nous intéresserons aux mécanismes mis en œuvre par le rotavirus. Dans un premier temps, nous présenterons le rotavirus en lui-même : son histoire, ses différentes caractéristiques en termes de génome, protéines codées, cycle de réplication. Puis nous entrerons ensuite plus en détail sur les mécanismes de traduction et les différents modèles proposés impliquant la protéine virale NSP3. Nous retracerons l'histoire de cette protéine afin de comprendre les tenants et aboutissants des travaux effectués lors de mon doctorat.

## Partie II : Rotavirus

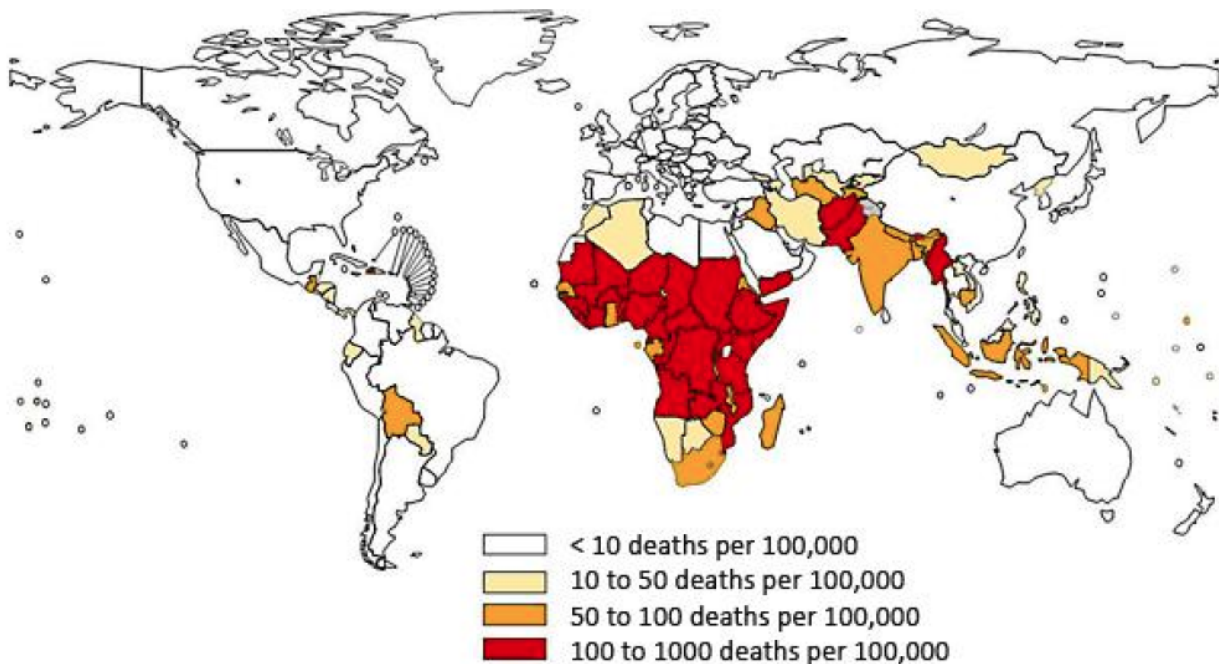
### I/ Introduction

#### A/ Importance du rotavirus en santé humaine et animale

Le rotavirus, identifié tout d'abord dans les feces d'animaux (Mebus et al., 1971) puis chez l'homme par la microbiologiste Ruth Bishop en 1973 à l'université de Melbourne (Bishop et al., 1973), constitue un problème en santé publique humaine ainsi qu'un problème économique dans les élevages d'animaux. C'est une cause majeure de gastro-entérites aiguës d'origine virale dans le monde, pouvant être mortelles chez les enfants en bas âges (moins de 3 ans). On estime à environ 500 000 par an le nombre de morts causées par le rotavirus. Sont touchés principalement les pays pauvres ou en voie de développement avec 90% des décès situés en Asie et en Afrique subsaharienne (Figure 19) (Parashar et al., 2009; Tate et al., 2012).

Ce virus, retrouvé chez plusieurs espèces animales (primates, bovins, ovins, porcins, aviaires), est un virus icosaédrique ayant un aspect de roue sur les premières images de microscopie électronique ce qui est à l'origine de son nom (rota = roue en latin). Le rotavirus appartient à la famille des *Reoviridae* comprenant des virus non-enveloppés dont le génome est composé de 10 à 12 segments d'ARN double brins protégés par 2 à 3 couches protéiques constituant la capside virale.

**Figure 19 : Distribution des décès causés par les infections au rotavirus dans le monde (Tate et al., 2012).**





## **B/ Description de la particule**

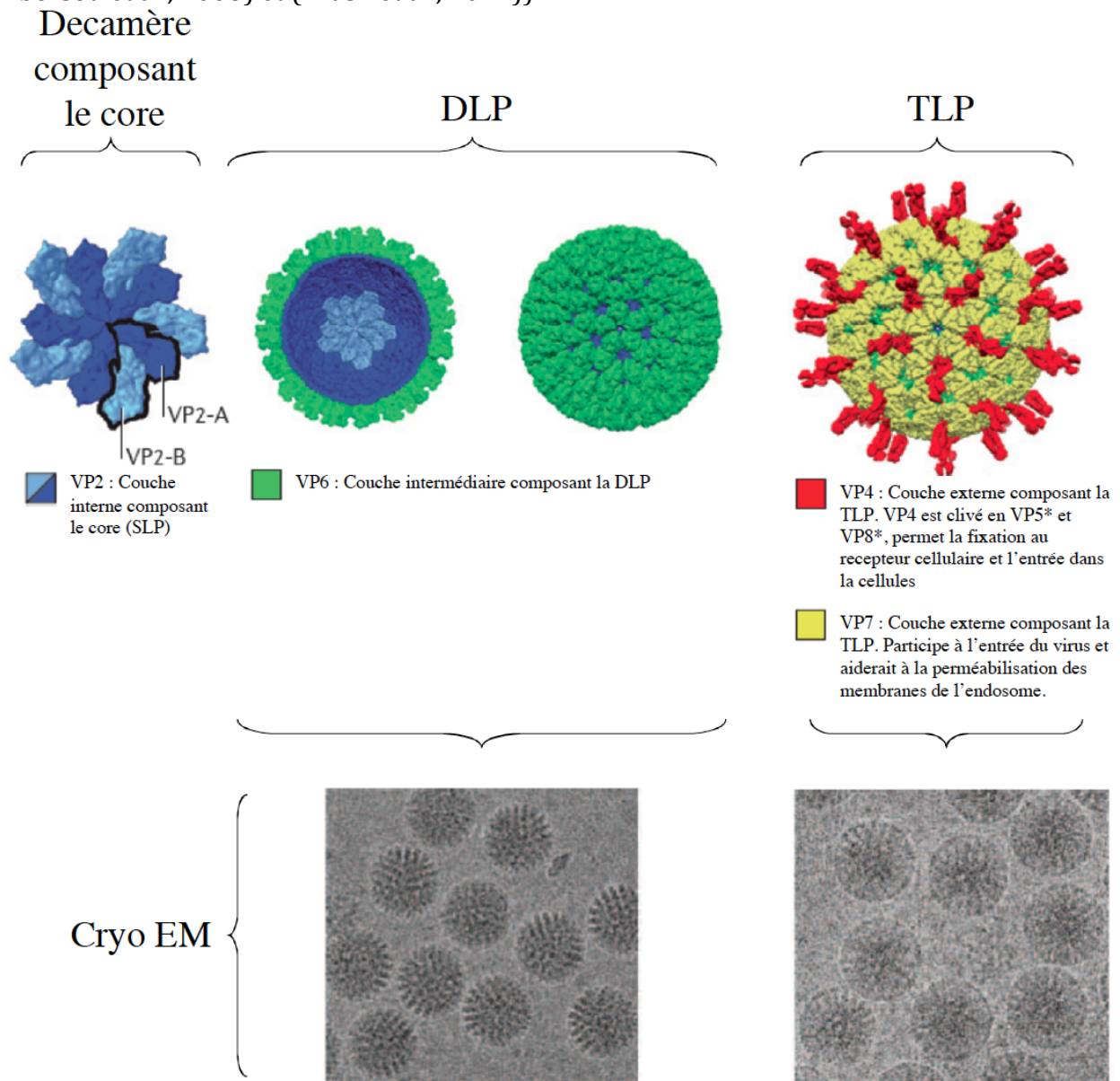
Le genre rotavirus est subdivisé en 5 groupes antigéniques (de A à E) définis par la protéine de capsid VP6 (les virus d'un même groupe partagent les mêmes épitopes sur VP6). Deux groupes provisoires (F et G) et, plus récemment, une nouvelle espèce non affectée (H) ont aussi été définis (Marthaler et al., ; Matthijnssens et al., 2011). Les groupes A, B, C et H sont retrouvés chez l'Homme et les animaux, avec chez l'Homme, une majorité des souches appartenant au groupe A. Les groupes D à G n'ont été retrouvés que chez les animaux. Une subdivision supplémentaire permet ensuite de classer les virus au sein du groupe A selon leurs sérotypes et génotypes P (=sensible aux Protéases) ou G (=Glycoprotéine) respectivement définis par les protéines externes VP4 et VP7 (Ciarlet et al., 2002; Estes and Graham, 1985). On dénombre 27 génotypes de type G, et 35 génotypes de type P en 2011 (Matthijnssens et al., 2011), cependant, on ne trouve qu'un certain nombre de combinaisons parmi les 945 possibles.

Le rotavirus est un virus non enveloppé de 75nm de diamètre à capsid à symétrie icosaédrique constituée de trois couches protéiques (Prasad et al., 1988; Yeager et al., 1990). Trois types de particules peuvent être distingués selon le nombre de couches présentes (Figure 20) :

- Les « Triple Layered Particle » ou TLP constituent les particules infectieuses.
- Les « Double Layered Particle » ou DLP, non infectieuses mais capables de synthétiser les ARNm de polarité positive à partir des ARN double brins encapsidés. Ces particules peuvent être rendues infectieuses si elles sont introduites dans les cellules.
- Les « Single Layered Particle » ou « core » contiennent les 11 segments d'ARN constituant le génome viral mais ne sont pas infectieuses et sont incapables de transcrire les gènes viraux.

**Figure 20 : Les différentes particules de rotavirus.**

Trois types de particules virales peuvent être visualisées en microscopie électronique : les core (ou SLP pour « Single-layered Particles, non présentées ici) correspondant à des particules non infectieuses et transcriptionnellement inactives ; les Double-Layered Particles (DLP) correspondent à des particules non infectieuses et transcriptionnellement actives ; enfin les Triple-layered Particles (TLP) correspondent aux particules infectieuses. Les cores sont composés de la protéine virale VP2 protégeant les 11 segments d'ARN double brins du génome ainsi que le complexe VP1 et VP3. Les DLP sont composées d'une couche supplémentaire composée uniquement de la protéine VP6. Enfin les TLP comportent une troisième couche protéique composée de VP4 et VP7 (les figures sont tirées et modifiées de (Libersou et al., 2008) et (Trask et al., 2012)).

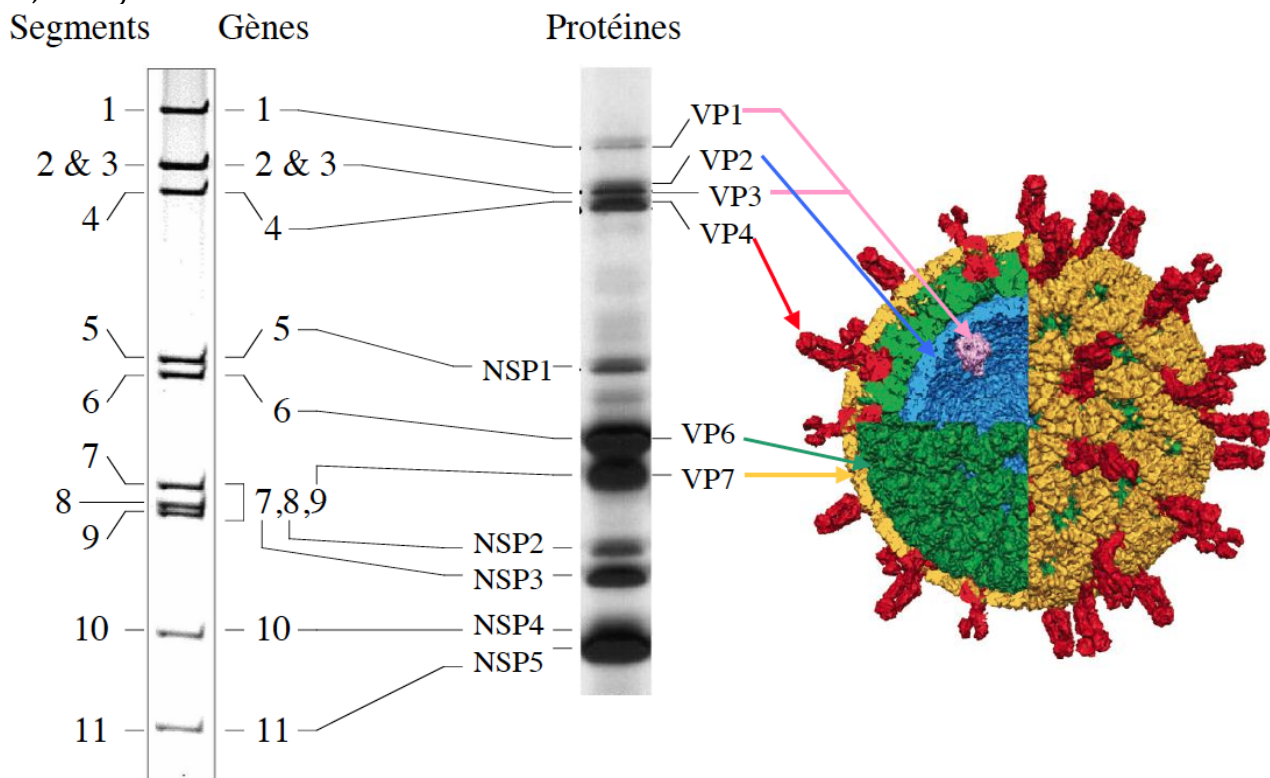


Le génome du virus code pour 6 protéines de structures (VPX) et 6 protéines non structurales (NSPX) et est contenu dans le core constitué majoritairement de la protéine VP2 (Figure 21) (120 molécules). A l'intérieur du core, le génome est associé aux protéines VP1 (12

molécules), ARN polymérase ARN dépendante et VP3 (12 molécules), enzyme de « coiffage » en 5' des ARN messagers, ces deux dernières étant positionnées sur les axes de symétrie d'ordre 5 (Estes and Kapikian, 2007; McClain et al., 2010; Prasad et al., 1996; Trask and Dormitzer, 2006). La couche intermédiaire est constituée par l'interaction entre VP2 et les trimères de VP6 (260 trimères) (Mathieu et al., 2001). VP6 est l'antigène de groupe et la protéine majoritaire du virus. Enfin, la couche externe est constituée de VP4 (180 molécules organisées en 60 trimères) et de VP7 (260 trimères) qui interagissent avec VP6 de la couche intermédiaire (Jayaram et al., 2004; Prasad et al., 1990). La particule possède en outre 132 canaux divisés en 3 types (de 40 à 55Å de large et de 140Å de profondeur) permettant l'entrée de molécules nécessaires à la transcription des ARNm, et la sortie de ces derniers (Estes and Kapikian, 2007; Trask et al., 2012).

**Figure 21 : Le génome du rotavirus et les protéines virales correspondantes.**

Le génome du rotavirus est composé de 11 segments d'ARN double brins. Il code pour 6 protéines structurales (VP) et 6 protéines non structurales (NSP) ; ainsi chaque gène code pour une seule protéine virale, à l'exception du gène 11 de certaines souches codant pour deux protéines non structurales NSP5 et NSP6 (non visible sur le gel) (Gault, 1998; Trask et al., 2012).

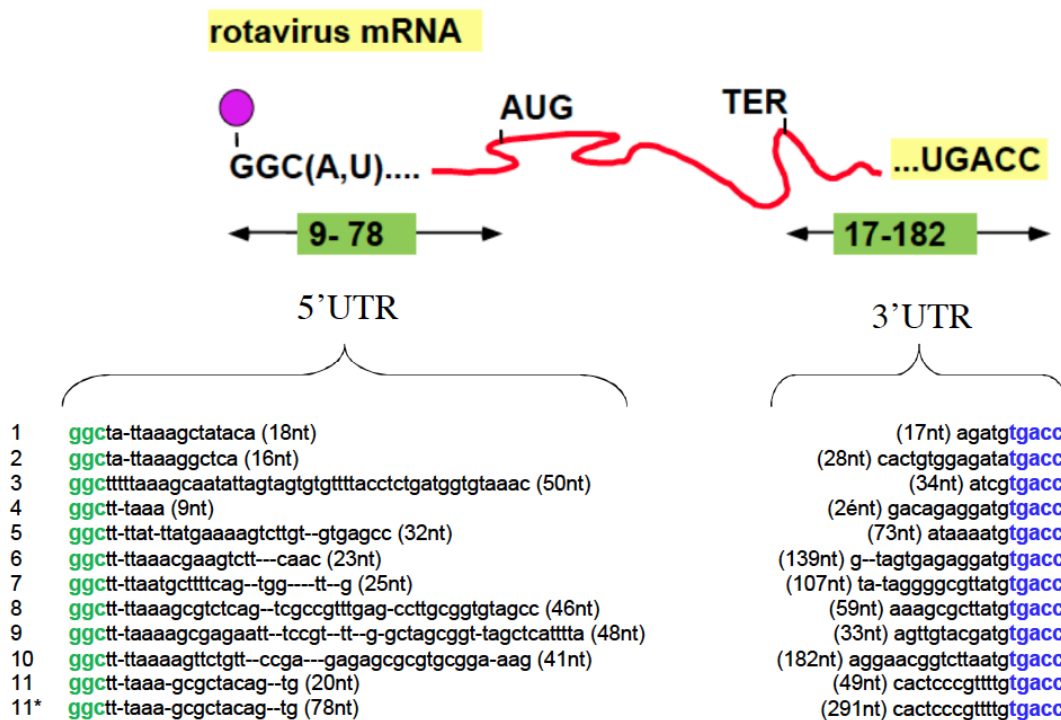


### C/ Le génome viral

Le génome du rotavirus est composé de 11 segments d'ARN double brins, séparables par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dont la taille varie de 0,7 à 3kb pour un total d'environ 18kb (Baker et al., 1999). Chaque segment possède un brin positif coiffé en 5' mais non polyadénylé à l'extrémité 3' et un brin négatif 5' triphosphate (Figure 22). Chaque segment code pour une seule protéine, excepté le gène 11 qui, dans certaines souches, code pour deux protéines (Mattion et al., 1991). Chaque cadre de lecture est encadré par des régions transcrites non traduites (UTR ; untranslated region) en 5' et 3' (Imai et al., 1983; Mattion et al., 1991; McCrae and McCorquodale, 1983). Ces UTR sont variables entre les segments mais bien conservées entre segments homologues de virus d'un même groupe. Deux courtes séquences sont retrouvées à l'extrémité de chaque gène des virus de groupe A ; GGC(A,U)<sub>n</sub> (avec n=6-10) en 5' et UGACC en 3' (Desselberger and McCrae, 1994).

**Figure 22 : Représentation schématique des ARNm de rotavirus.**

Les ARNm de rotavirus sont synthétisés par la polymérase virale VP1 après la perte de la couche externe protéique composant les TLP. Ce sont des ARN messagers coiffés à leur extrémité 5' (par la protéine virale VP3) et qui comportent une courte séquence 5'GGC qui est conservée dans tous les gènes suivie d'une séquence riche en U et A de 6 à 9 nucléotides. A l'extrémité 3', une séquence consensus UGACC est retrouvée. La longueur des régions non codantes en 5' et 3' varie selon le gène. Dans certaines souches, la séquence 3' des gènes 5 et 7 présente des variations (GAACC, GGCC). L'alignement des séquences 5' et 3' UTR présentées est issu des gènes de rotavirus de souche RF contrôlés par 3' RACE sur l'ARNds. Les longueurs des 5' et 3' UTR de chaque segment sont indiquées. Le gène 11\* correspond au cadre de lecture alternatif du gène 11 aboutissant à la synthèse de la protéine NSP6.



En 5', le second G de la séquence conservée est nécessaire pour la reconnaissance par la polymérase VP1 lors de la réplication (Tortorici et al., 2006) de même qu'une structure en épingle à cheveux aiderait à la réplication (Chen and Patton, 1998; Li et al., 2010; Patton and Spencer, 2000; Tortorici et al., 2003).

En 3', les deux dernières bases CC sont primordiales pour l'initiation du complexe de réplication (Chen et al., 2001; Chen and Patton, 2000). De même, les 4 nucléotides **UGUGACC** ainsi que d'autres signaux en amont sont nécessaires pour une bonne affinité avec la polymérase VP1 (Tortorici et al., 2003). Toujours en 3', la séquence GACC a été caractérisée pour être reconnue par la protéine virale NSP3, qui intervient dans la traduction des ARNm viraux (Voir p77). Des variants pour cette extrémité sont aussi retrouvés chez certains segments. Les gènes 5 (codant NSP1) des deux souches SA11 et RRV présentent des extrémités 3' non canoniques (Dunn et al., 1994; Matthijnssens et al., 2008; Patton, 2001) suivant les conditions de cultures du virus (Kearney et al., 2004). De même, l'extrémité du gène 7 codant NSP3 chez le virus de souche SA11 est GGCC.

### 1/ Variabilité des rotavirus

L'organisation du génome sous forme de segments indépendants constitue une source de variation génétique par réassortiment (échange de segments entre virus infectant une même cellule). De plus, des erreurs peuvent être introduites par la polymérase durant la réplication et, plus rarement, des événements de recombinaison au sein d'un même segment (réarrangement) peuvent aussi survenir (Estes and Kapikian, 2007). Un seul cas de recombinaison (non-viable) entre deux segments (gènes) différents a été décrit (Cao et al., 2008).

#### a/ Réassortiment

Le réassortiment est un phénomène d'échange de segment lors de coinfection d'une cellule par deux virus différents. Aucune pression de sélection n'est nécessaire pour que cela se produise. En culture de cellule, une infection mixte conduit à l'émergence de 50% de réassortants après un cycle viral (Garbarg-Chenon et al., 1984). Chez la souris, après 12h d'infection par les souches simiennes RRV et SA11, 25% des virus sont des réassortants, puis 100% des virus sont des réassortants 96h après infection (Gombold and Ramig, 1986). Néanmoins, tous les segments ne réassortent pas de manière indépendante, dans certains cas, une co-ségrégation de segments est observée. Ce phénomène constitue la base de la notion de constellation (Chen et al., 1989; Nibert et al., 1996) et reflète l'interaction entre ces gènes ou entre les protéines codées par ces gènes. Ainsi, selon le contexte génétique, un gène issu d'une souche différente peut s'exprimer différemment ou

l'activité de la protéine correspondante à ce gène peut être affectée. De fait, certaines combinaisons (constellations) de gènes pourraient être plus favorables que d'autres (Chen et al., 1989).

Si les virus au sein d'un même groupe peuvent réassortir, il n'a pas été possible d'obtenir de réassortants issus d'infection entre rotavirus de groupe A et rotavirus de groupe B (Ramig, 1997). Plusieurs explications sont possibles dans ce cas, d'une part, cela pourrait être dû au fait que les virus de groupe B utilisés n'étaient pas adaptés à la culture en cellule ; d'autre part, les différences au sein des séquences consensus notamment à l'extrémité 3' non codante pourraient intervenir lors de l'encapsidation des gènes. Il y aurait alors des signaux exclusifs selon la souche étudiée ce qui empêcherait la production de réassortants. Enfin, une incompatibilité entre séquences protéiques n'est pas exclue donnant lieu à des virus réassortants non-viables.

### *b/ Réarrangement*

Le réarrangement a été caractérisé par le profil atypique des segments d'ARN double brins observés après électrophorèse sur gel d'acrylamide. Découverts d'abord chez les enfants (Hundley et al., 1987; Pedley et al., 1984) et les animaux (Bellinzoni et al., 1987; Pocock, 1987; Thouless et al., 1986) atteints d'infection chronique par le rotavirus, les réarrangements aboutissent à une duplication plus ou moins importante d'un gène. Ce phénomène a été principalement observé avec le gène 11 codant NSP5, et moins fréquemment pour les gènes 5 à 10 et a pu être reproduit en culture cellulaire (Alam et al., 2008; Hundley et al., 1985; Kojima et al., 2000).

La plupart des réarrangements produisent des segments avec une 5' UTR complète et une partie de l'ORF fusionnée à un gène complet. Dans certains cas cependant, seule l'ORF est dupliquée comme pour le gène 5 (codant NSP5) et le gène 7 (codant NSP3) (Gault et al., 2001; Tian et al., 1993). Si dans le cas d'enfants immunocompétents, les virus réarrangés sont rarement retrouvés, notamment parce qu'un virus sauvage se multiplie plus efficacement (Kojima et al., 1996b; Schnepf et al., 2008), le phénomène inverse est observé chez des personnes immunodéprimées, laissant penser que les virus réarrangés ont un avantage sélectif dans ces conditions (Gault et al., 2001; Hundley et al., 1987; Oishi et al., 1991). Cela a été étudié en culture de cellules où l'enchaînement de plusieurs passages en culture permet d'observer une sélection des virus réarrangés au détriment des virus sauvages (Chnaiderman et al., 1998; Hundley et al., 1985; Mattion et al., 1990; Xu et al., 1996). De fait, bien que le mécanisme reste incompris, les gènes réarrangés présenteraient un avantage lors de l'encapsidation (Troupin et al., 2011), un mécanisme qui a été utilisé pour des expériences de génétique inverse sur le rotavirus (Troupin et al., 2010).



### c/ Mutations ponctuelles

Il a été estimé que l'infidélité de la polymérase virale est de l'ordre de  $10^{-6}$  par nucléotide (Flores et al., 1988). Un phénomène de glissement antigénique a d'ailleurs été mis en évidence, avec des mutations qui apparaissent de manière aléatoire sur le génome et sélectionnées par la pression de sélection : en particulier, les gènes codant les protéines externes de capsid, VP4 et VP7, sont plus susceptibles de varier du fait de l'exposition de VP4 et VP7 aux anticorps et de la pression de sélection exercée par le système immunitaire (Coulson, 1987; Taniguchi and Urasawa, 1995; Taniguchi et al., 1990). La protéine non structurale NSP1 est aussi susceptible de mutations : il est d'ailleurs observé une forte variabilité entre les séquences codantes de NSP1 de souches infectant des espèces différentes. A l'inverse, sa séquence est conservée au sein de virus infectant une même espèce indiquant que NSP1 serait un facteur de restriction de l'hôte (Barro and Patton, 2005; Dunn et al., 1994; Kojima et al., 1996a).

### 2/ Les protéines virales

Le génome viral code pour 12 protéines : 6 protéines structurales (VPx) constituant la particule virale ; et 6 protéines non structurales (NSPx) qui sont synthétisées dans la cellule au cours de l'infection mais qui ne constituent pas la particule virale.

### a/ La polymérase VP1

Codée par le gène 1 et d'un poids moléculaire de 125kDa, VP1 est présente en 12 exemplaires par virion (Figure 23). C'est une ARN polymérase ARN dépendante effectuant la transcription (synthèse de brins d'ARN de polarité positive à partir d'une matrice ARN double brin) et la réplication (synthèse du brin d'ARN de polarité négative complémentaire de la matrice ARN positif à laquelle il reste associé). Elle contient des motifs similaires à ceux retrouvés chez d'autres polymérases virales (Cohen et al., 1989; Mitchell and Both, 1990) et reconnaît des éléments de séquence de l'extrémité 3' du brin positif de l'ARN (Chen and Patton, 2000; Patton, 1996; Tortorici et al., 2003).

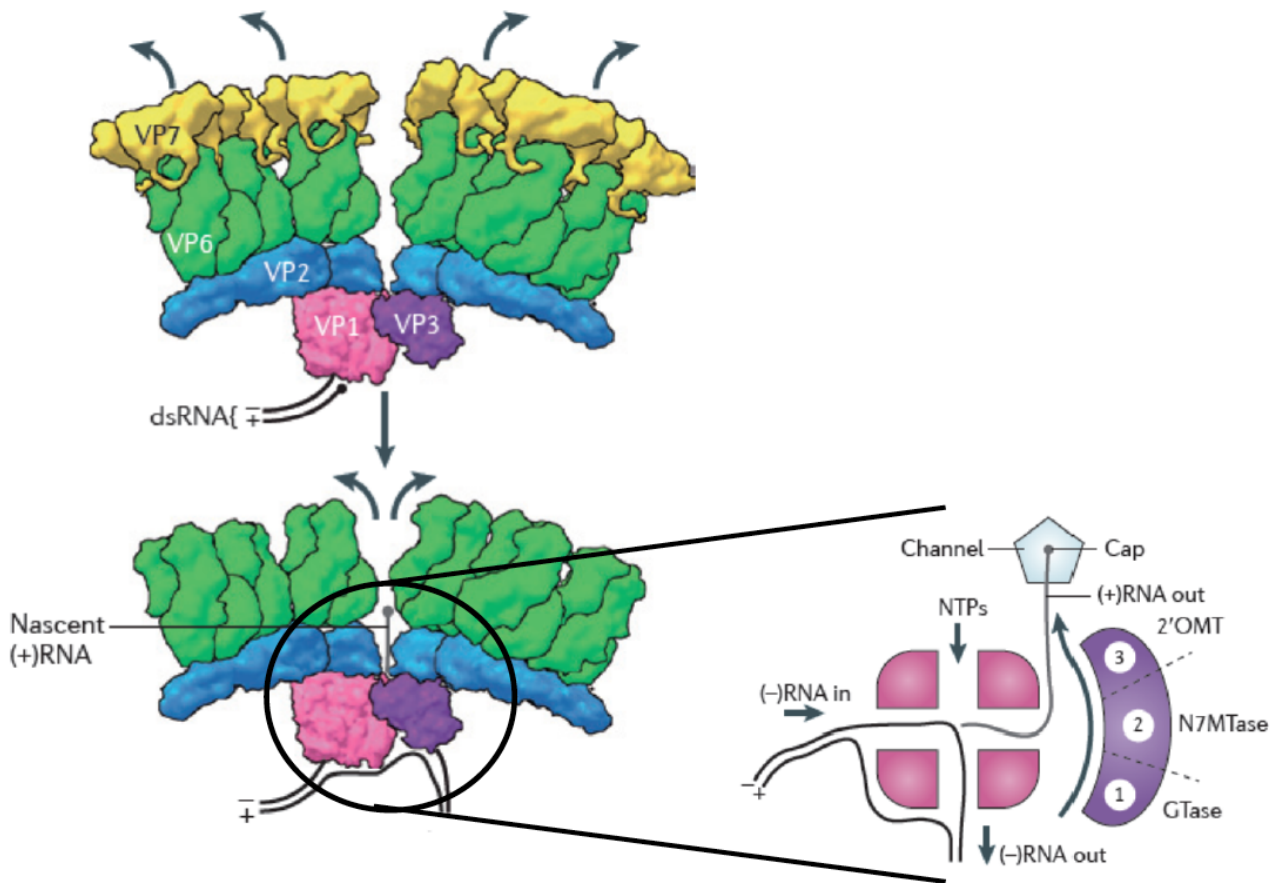
La structure de VP1 montre la présence de 4 canaux permettant l'accès des nucléotides et des ARN matrice (positif ou négatif selon l'activité transcription ou réplication) au site catalytique central de la polymérase (Lu et al., 2008).

Au sein de la particule virale, VP1 fait partie intégrante du core en association avec les protéines VP2 et VP3 et l'ARN double brin mais ne présente une activité transcriptase que lorsqu'elle est présente sous la forme de DLP. Lors de l'infection, VP1 s'associe avec les protéines non structurales NSP2 et NSP5 (Afrikanova et al., 1998; Aponte et al., 1996) au sein des

viroplasmes où est répliqué le génome viral. *In vitro*, l'activité réplicase de VP1 est dépendante de la présence de VP2 (Patton et al., 1997; Tortorici et al., 2003; Zeng et al., 1998; Zeng et al., 1996).

**Figure 23 : L'activation de la transcription par la polymérase virale VP1.**

Suite à l'entrée du virus, la particule virale perd sa couche protéique externe VP7 et VP4. Ceci a pour conséquence de provoquer l'ouverture des canaux permettant la sortie des ARNm synthétisés par VP1. La polymérase VP1 comporte elle-même 4 canaux permettant l'entrée des nucléotides et de l'ARN matrice (brin négatif de l'ARN double brin génomique) vers la partie centrale composant le site catalytique de la polymérase et de canaux permettant la sortie de l'ARNm (ARN positif) néosynthétisé vers l'extérieur de la capside, et vers l'intérieur de la particule pour l'ARN matrice (Figure tirée et modifiée de (Trask et al., 2012)).



**b/ La protéine du core VP2**

Codée par le gène 2 et d'un poids moléculaire de 94kDa, elle constitue la protéine d'échafaudage du core. Présente en 120 exemplaires au sein de la particule virale, les monomères de VP2 s'assemblent spontanément en pseudo particules virales ou VLP (Virus Like Particles) (Crawford et al., 1994; Labbe et al., 1991). VP2 et VP6 peuvent s'assembler spontanément (Charpilienne et al., 2002; Charpilienne et al., 2001; Libersou et al., 2008) et constituer des VLP 2/6 semblables à des DLP dépourvues de génome.



Il a été montré que la partie N terminale (1-132) est nécessaire pour la liaison de VP2 à l'ARN, avec une plus forte affinité pour l'ARN simple brin que pour l'ARN double brins (Boyle and Holmes, 1986; Labbe et al., 1994). De plus, le domaine N terminale (1-92) permet l'interaction avec VP1 et VP3 et donc l'incorporation de ces protéines virales dans les cores en cours de formation (Chen et al., 1994; Zeng et al., 1998). Outre son rôle structural, VP2 dispose aussi d'un rôle fonctionnel : *in vitro*, l'activité réplicase de VP1 ne peut s'exercer qu'en présence de VP2 (McDonald and Patton, 2011).

### c/ La protéine VP3

VP3 (88kDa) est une protéine basique présente en 12 exemplaires par virion au sein du core (Liu and Estes, 1989; Prasad et al., 1996). VP3 dispose des trois activités enzymatiques (NTPase, guanylyl transférase et méthylase) nécessaires à la constitution de la coiffe en 5' des ARN viraux lors de la transcription (Chen et al., 1999; Liu et al., 1992; Pizarro et al., 1991). *In vitro*, il a été montré qu'il n'y a pas besoin de VP3 pour induire la réplication du génome viral (Patton, 1996; Wentz et al., 1996). Cependant, sa présence au sein des complexes de réplication est nécessaire : des expériences *in vivo* par ARN interférents contre VP3 ou l'étude de mutants thermosensibles de VP3 montrent une diminution de la production virale, avec production de particules vides (Ayala-Breton et al., 2009; Vasquez et al., 1993). En plus de son activité de mise en place de la coiffe, VP3 possède une activité contre la réponse antivirale cellulaire. En effet, il a été montré récemment que VP3 avait une activité 2',5'phosphodiesterase permettant la dégradation des 2',5'-oligoadénylate dont la synthèse (par la 2',5'-oligoadénylase (2-5A) synthétase (OASs) induite par l'interféron) active la RNase L (Zhang et al., 2013).

### d/ La protéine de capsid externe VP4

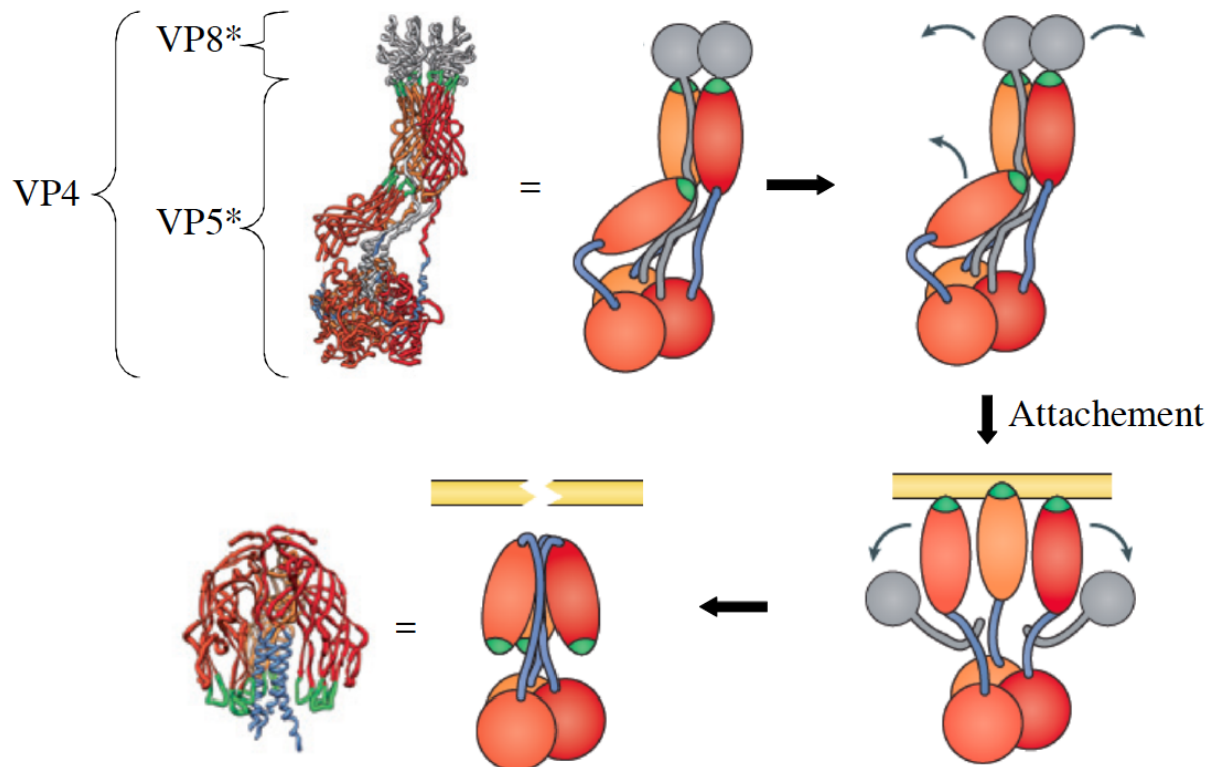
Codée par le gène 4 et d'un poids moléculaire de 87kDa, VP4 constitue, avec VP7, la couche externe de la capsid du rotavirus. Des anticorps neutralisants dirigés contre cette protéine inhibent l'attachement et l'entrée du virus (Burns et al., 1988; Hoshino et al., 1985; Ruggeri and Greenberg, 1991). Organisée en 60 spicules (Dormitzer et al., 2004) par particules virales, VP4 interagit directement avec VP7 et VP6 de la couche intermédiaire (Shaw et al., 1993; Yeager et al., 1994).

Lors de l'infection, il a été montré qu'un clivage de VP4 est nécessaire (Figure 24) : ce clivage conduit à la formation de deux fragments VP5\*, partie C terminale de 60kDa, et VP8\*, partie N terminale de 28kDa. VP8\* constitue la tête des spicules et VP5\* est ancrée dans la couche de VP7 et constitue le pied. Ce clivage peut être reproduit lors d'infection *in vitro* par ajout de trypsine dans le milieu de culture (Babiuk et al., 1977; Clark et al., 1981). C'est d'ailleurs ce

traitement du virus qui a permis son adaptation à la culture. Le fragment de VP8\*, qui contrairement à VP5\* n'interagit pas avec VP7 ou VP6, reste, dans un premier temps, associé au virion (Estes et al., 1981; Fiore et al., 1991; Shaw et al., 1993; Yeager et al., 1994). VP8\* permet l'arrimage du virus sur la membrane cellulaire via une liaison aux acides sialiques (Dormitzer et al., 2002; Haselhorst et al., 2009; Kraschnefski et al., 2009) ou à d'autres glycoconjugués comme les antigènes de groupes sanguins (Hu et al., 2012; Liu et al., 2013; Liu et al., 2012; Ramani et al., 2013).

**Figure 24 : La protéine de la couche externe, VP4.**

La protéine VP4 est l'une des deux protéines composant la couche externe des TLP où elle constitue les spicules. Lors d'une infection, VP4 est clivé en deux fragments, VP5\* et VP8\* (en gris sur le schéma). Ce clivage conduit à un changement de conformation qui permet l'attachement aux membranes cellulaires et l'entrée du virus. La figure présente la structure des trimères de VP4 avant et après pénétration du virus. Le schéma illustre les changements possibles de structures entre ces deux étapes (Trask et al., 2012).



A la suite du clivage de VP4, un changement de conformation s'opère avec l'association de deux monomères de VP4 (Figure 24), au sein de chaque trimère, en une structure rigide, le 3<sup>e</sup> monomère restant à part sous une forme plus flexible. Très récemment, il a été montré que ce mécanisme était particulier à la souche SA11-4F dont le gène 4 provient d'une souche bovine, les souches simienne SA11 et porcine OSU n'ayant pas besoin de ce clivage par la trypsine pour former des structures rigides (Rodriguez et al., 2014). Un autre changement de conformation dont la cause n'est pas défini (peut être suite à l'attachement), induit le repliement des deux monomères de

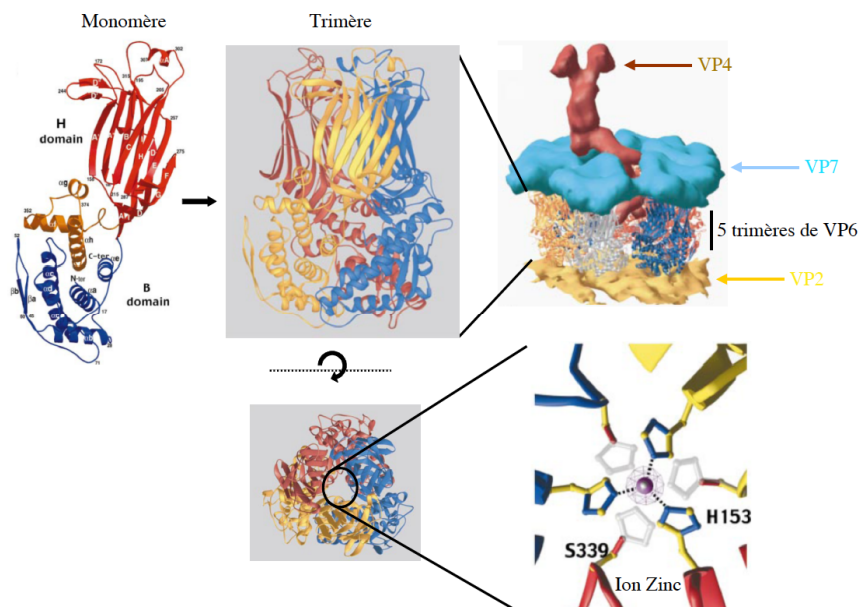
VP4 « rigide » pour rejoindre le troisième donnant lieu à un trimère avec une forme dite de parapluie replié. Le fragment VP8 se séparerait à ce moment de la particule virale. De plus, ce changement de conformation permet de mettre en avant un domaine hydrophobe de VP5, capable d'interagir avec la membrane de la cellule cible, et de promouvoir l'entrée du virus dans la cellule (Trask et al., 2010; Yoder and Dormitzer, 2006; Yoder et al., 2009). Par la suite, sous l'action combinée de VP5\* et de VP7, des liaisons aux intégrines sont effectuées permettant les étapes suivantes d'attachement et d'entrée du virus dans la cellule (Graham et al., 1987; Hewish et al., 2000; Zarate et al., 2000a; Zarate et al., 2000b).

#### e/ La protéine de capside intermédiaire VP6

Codée par le gène 6 et d'un poids moléculaire de 45kDa, VP6 est la protéine majoritaire du virus où elle est organisée en 260 trimères constituant la couche intermédiaire de la particule (Figure 25). La forme trimérique est fortement stabilisée par la présence d'un ion zinc qui interagit avec chacun des monomères de VP6 (Erk et al., 2003) et permet l'interaction avec le core via VP2 ainsi qu'avec les autres trimères de VP6. VP6 est composée de deux domaines principaux notés H et B : le domaine B, riche en hélice  $\alpha$ , forme la base de VP6 ; le domaine H, riche en feuillet  $\beta$ , constitue le sommet et permet l'interaction avec les protéines de la couche externe, VP4 et VP7 (Estes and Kapikian, 2007; Jayaram et al., 2004; Mathieu et al., 2001).

**Figure 25 : La protéine de la couche intermédiaire, VP6.**

La protéine VP6 est la protéine composant la couche intermédiaire des DLP. Organisée en trimères avec un ion zinc en son centre, VP6 subit un léger changement de conformation lors de la perte de la couche externe composée de VP4 et VP7. Ce changement de conformation se répercute au niveau du core (VP2, VP1 et VP3) et stimule la transcription (Mathieu et al., 2001).



La dissociation de la couche intermédiaire de VP6 ou l'addition de la protéine externe VP7 aux DLP, inhibe la transcription. La protéine VP6 sert donc de commutateur conformationnel de la transcription ; ne permettant le maintien de l'activité transcriptase que sous la forme de DLP. Il a été montré que l'activité transcriptase est dépendante de l'interaction de certains résidus de VP6 avec VP2 : le changement de conformation de VP6, lors de la perte de la couche externe, se répercuterait au niveau du core via VP2 (Bican et al., 1982; Charpilienne et al., 2002; Thouvenin et al., 2001).

Le blocage de la transcription peut aussi être obtenu à l'aide d'anticorps dirigés contre VP6 qui provoqueraient le même type de changement conformationnel de VP6 que l'addition de VP7. C'est ce mécanisme qui permettrait aux IgA anti-VP6 de neutraliser le virus lors de leur transcytose dans les entérocytes. Compte tenu de la conservation de la protéine VP6, ce mécanisme permet une large protection contre l'ensemble des rotavirus de groupe A (Burns et al., 1996; Corthesy et al., 2006; Feng et al., 2002; Schwartz-Cornil et al., 2002).

### fl La protéine de capsid externe VP7

Codée par le gène 9 et d'un poids moléculaire de 38kDa, cette glycoprotéine est aussi organisée en 260 trimères (structure résolue, (Aoki et al., 2009)) et compose, avec VP4, la couche externe de la particule virale. Sa conformation est dépendante de la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  permettant la formation des trimères (Figure 26) (Dormitzer and Greenberg, 1992; Dormitzer et al., 2000; Gajardo et al., 1997).

A nouveau, du fait de son exposition vers l'extérieur de la particule, la reconnaissance de VP7 par des anticorps inhibe la fixation et l'entrée du virus dans la cellule (Ludert et al., 2002; Ward et al., 1990). VP7 participe à l'entrée du virus dans la cellule en interagissant notamment avec les intégrines  $\alpha\text{x}\beta 2$  et  $\alpha\text{v}\beta 3$  (Graham et al., 2003; Zarate et al., 2004). Suite à l'entrée du virus dans la cellule, une baisse de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans les endosomes provoque la dissociation de la couche externe par un changement de conformation et détachement de VP7. Deux phénomènes sont alors observés :

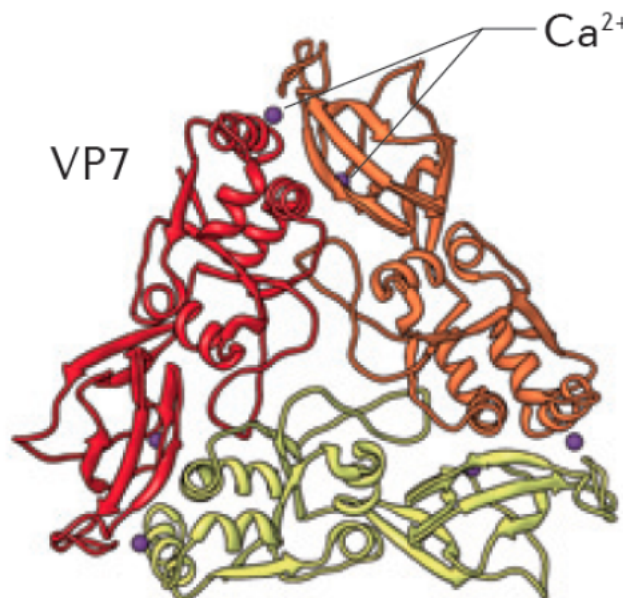
D'une part, la dissociation de VP7 induit un changement de conformation de VP6, permettant l'activation transcriptionnelle des DLP (Feng et al., 2002; Thouvenin et al., 2001). Cette étape de dissociation de VP7 et d'activation de la transcription est reproduite *in vitro* par chélation du  $\text{Ca}^{2+}$  par l'EGTA. A l'inverse, l'ajout des protéines VP4 et VP7 recombinantes nécessite la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et d'un pH acide (Cohen et al., 1979; Trask and Dormitzer, 2006).

D'autres part, VP7 aurait un rôle dans la perméabilisation des membranes de l'endosome dans lequel le virus se trouve s'il suit la voie d'endocytose classique (Charpilienne et al., 1997).

Après la dissociation de la TLP induite par la baisse de concentration en calcium dans les endosomes, la digestion de VP7 par la trypsine génère des peptides ayant des propriétés détergentes ou des capacités à modifier ou perforer les membranes (Charpilienne et al., 1997; Elaid et al., 2014). Ces modifications provoquant l'éclatement des endosomes et donc la libération des DLP dans le cytoplasme de la cellule.

### Figure 26 : La protéine de la couche externe, VP7.

La protéine VP7 est l'une des deux protéines composant la couche externe des TLP. C'est une glycoprotéine organisée en trimères via notamment des liaisons avec des ions calcium aidant à la trimérisation. VP7 se dissocie suite à la baisse de la concentration en calcium au sein des endosomes. VP7 aurait ensuite un rôle dans la perméabilisation de la membrane de l'endosome permettant la libération de la particule virale dans le cytoplasme de la cellule (Trask et al., 2012).



### g/ La protéine NSP1

Codée par le gène 5 et d'un poids moléculaire de 59kDa, NSP1 est une protéine non structurale capable de lier les ARN simple brins via deux motifs conservés en « doigt de zing ». NSP1 a tout d'abord été impliquée dans l'étape de réplication (Figure 27) (Gonzalez et al., 1998; Hua et al., 1994; Taniguchi et al., 1996a).

Cependant, en culture de cellule, cette protéine n'est pas indispensable à la réplication virale puisque chez certains virus mutants (virus bovin A5-16), la protéine NSP1 existe sous une forme très raccourcie de 50 acides aminés, au lieu de 490 (Patton, 2001; Taniguchi et al., 1996b). Il faut toutefois noter que ces virus déficients pour NSP1 présentent des plages de lyses plus petites que leurs homologues sauvages semblant indiquer que NSP1 aide la propagation du virus.

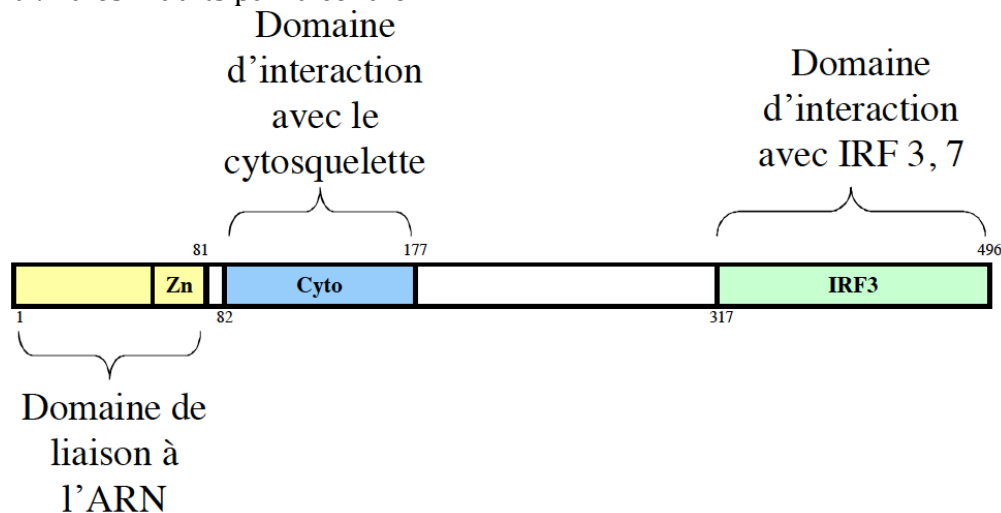
Plus récemment, des expériences ont permis de préciser le rôle de NSP1 :

- NSP1 serait capable d'inhiber les voies d'interféron (IFN) soit en induisant la dégradation de certains facteurs cellulaires comme IRF-3, 5 ou 7, soit en favorisant les répresseurs cellulaires des voies IFN notamment par dégradation par la voie protéasome (Barro and Patton, 2005, 2007; Graff et al., 2009; Sen et al., 2009).
- Le domaine de liaison à l'ARN est riche en cystéine et en histidine formeraient alors un « ring finger » caractéristique des ligases à ubiquitine (Graff et al., 2007).
- De plus, NSP1 inhiberait l'activation des voies d'apoptose en agissant sur le facteur cellulaire p53 (Bhowmick et al., 2013).

De fait, si NSP1 n'est peut être pas capitale pour la réplication du virus *in vitro*, sa présence aiderait le virus à outrepasser les différents mécanismes de défenses antivirales induits par la cellule, et aiderait à la dissémination du virus.

### Figure 27 : La protéine non structurale NSP1.

La protéine NSP1 est composée de plusieurs domaines : un domaine de liaison à l'ARN, un autre de liaison au cytosquelette et un domaine carboxy terminal de liaison au « Interferon Regulatory Factor » (IRF). Cette protéine serait impliquée dans l'inhibition des systèmes de défenses antivirales induits par la cellule.



### h/ La protéine NSP2

Codée par le gène 8 et d'un poids moléculaire de 37kDa, il a été montré que, durant l'infection, NSP2 s'organise en octamères et a la capacité de lier des ARN simple brins de manière non spécifique via une séquence conservée à son extrémité C terminale (Figure 28) (Jayaram et al., 2002; Schuck et al., 2001; Taraporewala et al., 1999).

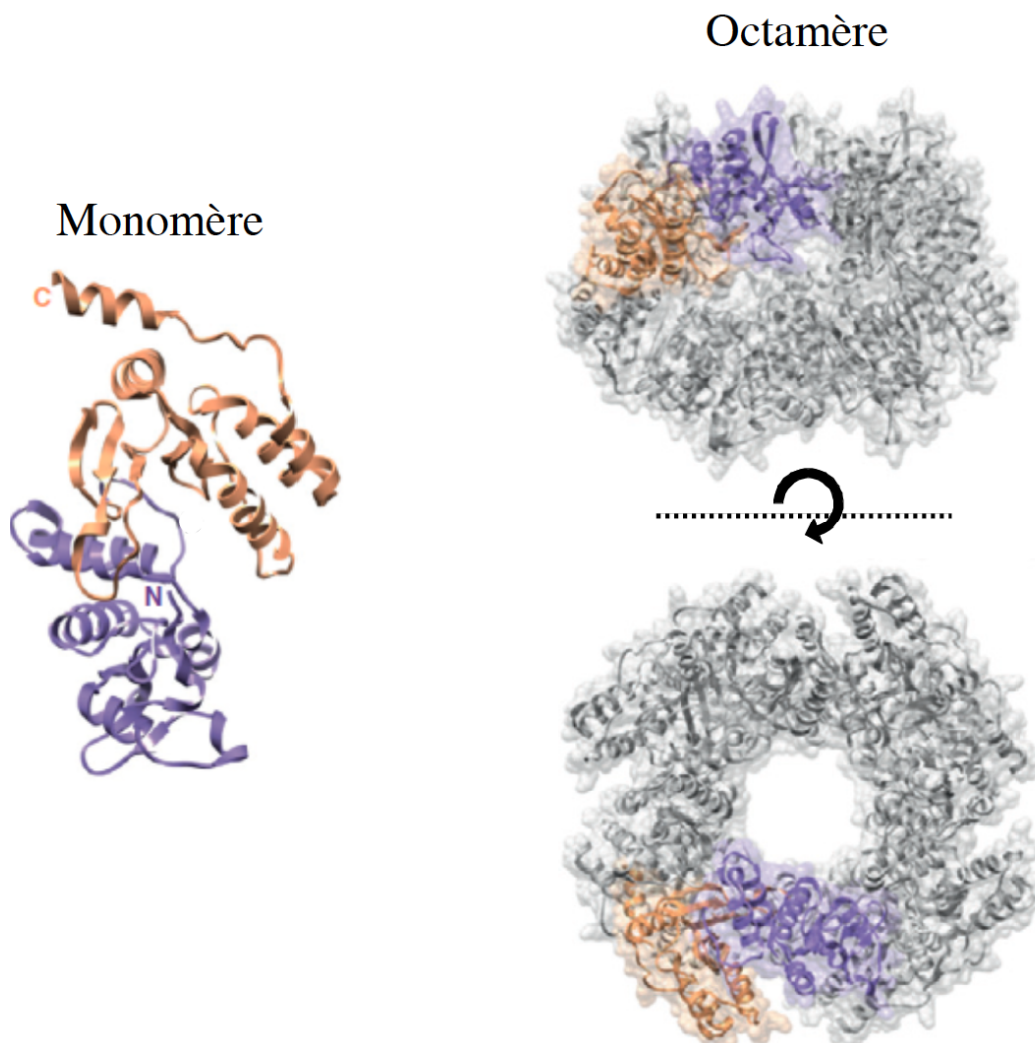
En outre, NSP2 est capable de former des viroplasmes ou usines virales avec l'action conjointe de NSP5 (Afrikanova et al., 1998; Fabbretti et al., 1999; Poncet et al., 1997). Cette protéine possède aussi une activité hélicase, nucléotide triphosphatase, ARN triphosphatase et nucléoside diphosphatase (Hu et al., 2012; Kumar et al., 2007; Taraporewala et al., 1999).



Ces différentes caractéristiques ainsi que des expériences par ARNi contre NSP2 (Silvestri et al., 2004) ou l'utilisation de mutants thermosensibles de NSP2 (Ramig and Petrie, 1984), ont permis de confirmer que NSP2 est une protéine clé dans la réplication du virus. Récemment, il a été montré l'existence de deux formes de NSP2. La première forme, phosphorylée en position 313, est retrouvée associée à NSP5 dans les viroplasmes, alors que la seconde forme non phosphorylée est présente dans le reste du cytoplasme (Criglar et al., 2013).

**Figure 28 : La protéine non structurale NSP2.**

La protéine NSP2 est capable de lier les ARN simple brins de manière non spécifique, possède une activité hélicase et NTPase, et est impliquée, avec NSP5, dans la formation des viroplasmes (Hu et al., 2012). Elle s'assemble en octamères pour former une structure en anneau (donut) assez large au centre pour le passage de l'ARN double brins. Les ARN se fixent sur la face externe de l'anneau (Hu et al., 2012).



### *i/ La protéine NSP3*

Codée par le gène 7 et d'un poids moléculaire de 35kDa, NSP3 a été caractérisée pour son implication les mécanismes de traduction cellulaire et virale. Une partie dédiée à cette protéine est présentée plus loin (Voir p77).

### *j/ La protéine NSP4*

NSP4, codé par le gène 10 et d'un poids moléculaire de 20kDa, contient comme VP7 un peptide signal ainsi que des domaines transmembranaires conduisant NSP4 à être synthétisée et incorporée au sein des membranes du RE (Maass and Atkinson, 1990).

NSP4 a été caractérisée dans différents mécanismes lors de l'infection. Cette protéine aiderait au bourgeonnement des DLP dans le RE en formant une couche transitoire autour de la DLP, avant l'acquisition de la couche externe formée de VP7 et VP4 (Lopez et al., 2005; Tian et al., 1996). De plus, elle induirait la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE vers le cytoplasme, et jouerait sur différents points comme l'assemblage des particules virales, ou lors de leur association au niveau des rafts (Cuadras et al., 2006; Lopez et al., 2005; Silvestri et al., 2005; Zambrano et al., 2008).

Enfin, NSP4 a été caractérisée comme la première « entérotoxine virale » : en augmentant la concentration cellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$ , en induisant des changements de perméabilité des membranes cellulaires et du cytosquelette. De fait, la perturbation de la cellule ainsi aiderait à la dissémination du virus (Ball et al., 2005). Plus récemment la capacité de NSP4 à augmenter la concentration cellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  a été identifiée comme étant la cause de l'activation de l'autophagie lors de l'infection. L'autophagie serait détournée lors de l'infection pour permettre le transport des protéines synthétisées au niveau du RE vers les viroplasmes (Crawford et al., 2012). Mais l'activation de l'autophagie lors de l'infection reste controversée (Arnoldi et al., 2014).

### *k/ La protéine NSP5*

Codée par le gène 11 et d'un poids moléculaire de 26kDa, c'est une protéine sujette à la phosphorylation dont le poids moléculaire apparent peut évoluer de 26kDa à 35kDa. Cependant, le mécanisme de phosphorylation ainsi que les sites de phosphorylation sur NSP5 restent peu définis.

Avec NSP2, NSP5 participe à la formation des viroplasmes et au rassemblement des autres protéines virales pour la réplication (Fabbretti et al., 1999).

L'état de phosphorylation de NSP5 pourrait intervenir sur différents points :

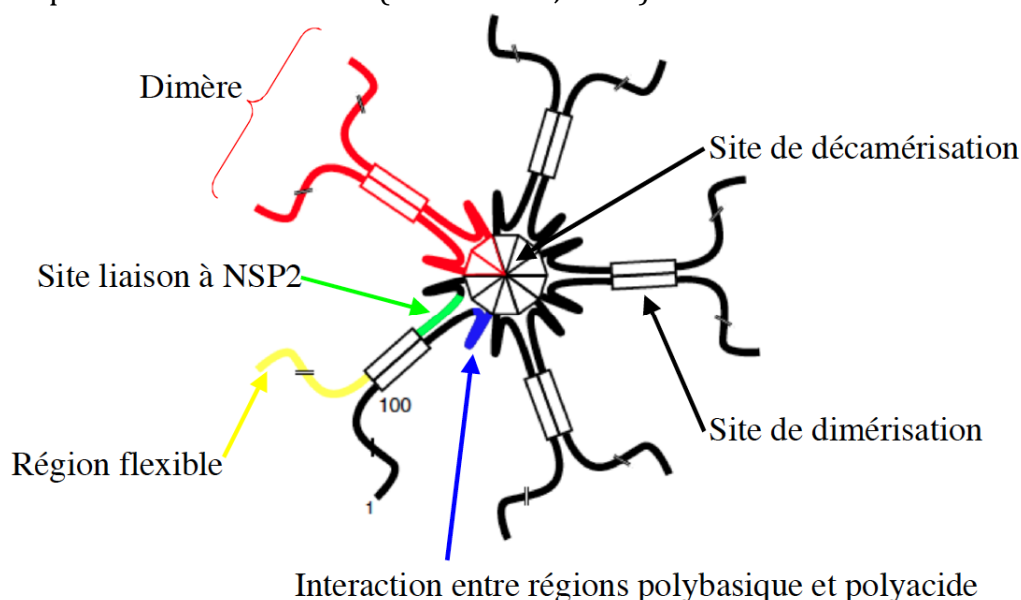
- Dans la modulation de l'équilibre entre la part des ARNm en traduction ou en réplication (Chnaiderman et al., 2002).
- Dans la modulation de la formation des viroplasmes (Campagna et al., 2007; Contin et al., 2010).



Par son extrémité C terminale, cette protéine est organisée en dimères dont la formation pourrait être modulée par la protéine NSP6 (Poncet et al., 1997; Sen et al., 2007; Torres-Vega et al., 2000). Comme NSP2, NSP5 est capable de lier de manière non spécifique les ARN simple et double brins, cette liaison aux ARN étant modulée par la présence dans les dimères d'un groupement Fer-soufre [2Fe-2S] (Martin et al., 2013). NSP5 a aussi été caractérisée comme étant organisée en décamères, ou plus exactement en pentamères de dimères, ce qui modulerait son interaction avec NSP2 et les autres protéines virales comme VP1 (Figure 29) (Martin et al., 2011).

### Figure 29 : Représentation schématique de la protéine non structurale NSP5.

La protéine NSP5 est une phosphoprotéine capable de lier les ARN simple brins de manière non spécifique et est impliquée, avec NSP2, dans la formation des viroplasmes. Elle serait organisée en pentamères de dimères (Martin et al., 2011).



En plus de VP1, NSP5 interagit aussi avec VP2 (Berois et al., 2003) ce qui empêcherait l'interaction de cette dernière avec VP6. Du fait de la capacité de VP2 et VP6 à s'auto-assembler et former des pseudo-particules virales, l'interaction avec NSP5 serait donc un moyen d'empêcher la formation trop précoce de la couche intermédiaire et promouvoir le recrutement de tous les segments d'ARN double brins à encapsider. Enfin, NSP5 agirait aussi en tant qu'intermédiaire entre NSP2 et le complexe de réplication VP1/VP2/VP3 (Berois et al., 2003).

Les résultats d'expériences d'inhibition d'expression par ARN interférent (ARNi) et d'inactivation de la protéine NSP5 par anticorps intracellulaires ont permis de montrer :

- Une baisse de la synthèse des ARN simple et double brins viraux.
- Une diminution de la synthèse protéique virale et donc de la formation de particules infectieuses (Campagna et al., 2005; Lopez et al., 2005; Vascotto et al., 2004).

- Une diminution de la taille des viroplasmes et de la dissémination des autres protéines virales, qui sont normalement localisées dans ces structures (Campagna et al., 2005; Lopez et al., 2005).

NSP5 aurait donc un rôle crucial dans l'organisation de la réplication et dans la réplication même du virus.

### // La protéine NSP6

Codée par le gène 11 via un cadre de lecture alternatif à celui de NSP5 et d'un poids moléculaire de 12kDa (Mattion et al., 1991), NSP6 constitue une protéine virale dont la fonction n'est pas vraiment connue. Présente en faible quantité et avec une faible demi-vie (Rainsford and McCrae, 2007), certaines souches de rotavirus ne codent pas pour NSP6, ou alors codent pour une forme tronquée. De ce fait, son rôle lors de la réplication du rotavirus est discuté (Gonzalez et al., 1989; Kojima et al., 1996b; Torres-Vega et al., 2000). Localisée dans les viroplasmes (Mattion et al., 1991), NSP6 présente différentes caractéristiques :

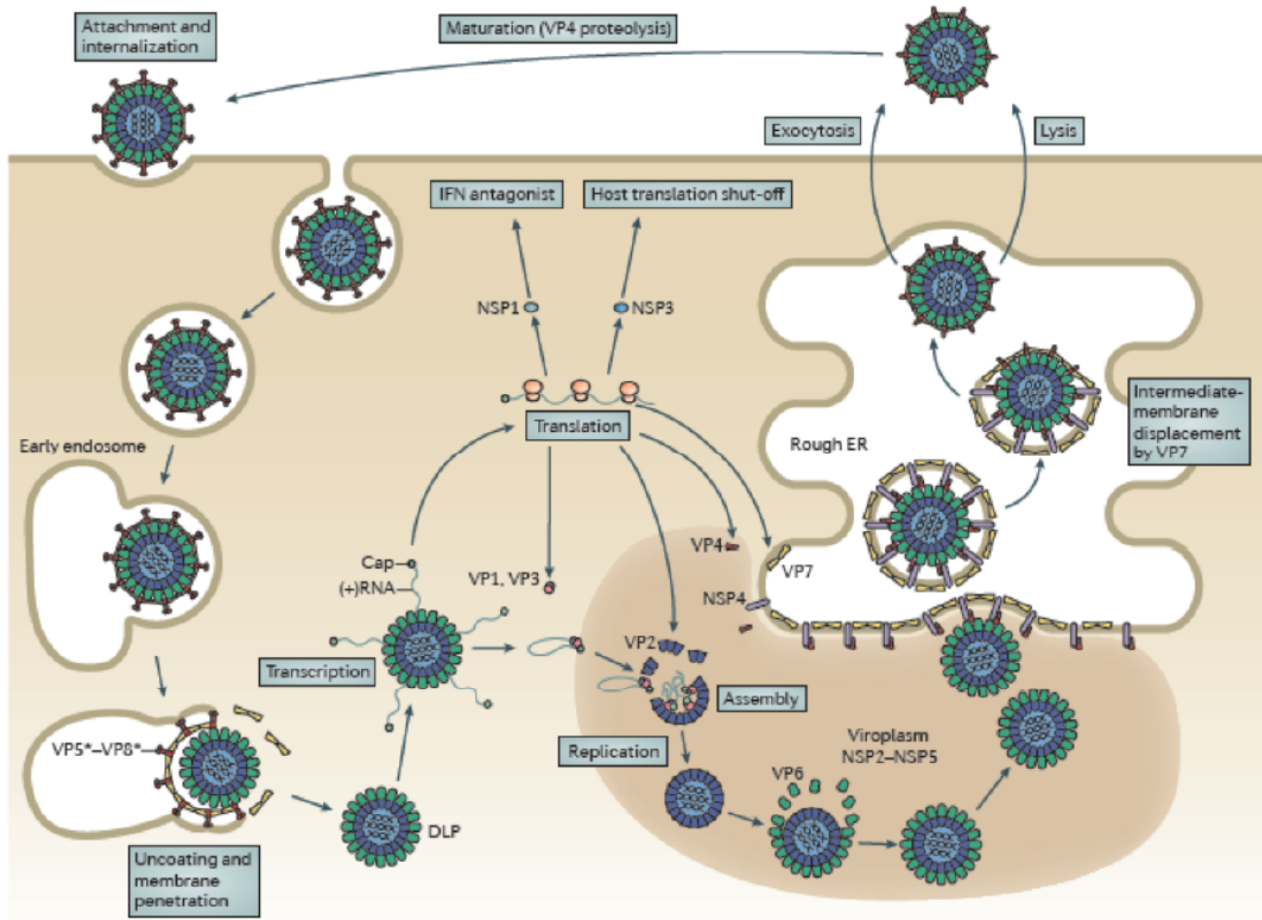
- Comme NSP5, c'est une protéine ayant une affinité pour les ARN simple et double brins (Rainsford and McCrae, 2007).
- De plus, elle peut interagir avec NSP5 via son domaine C terminal impliqué dans la dimérisation de NSP5. La phosphorylation de NSP5 étant dépendante de son état de dimérisation, NSP6 modulerait l'activité de NSP5, et donc modulerait la réplication virale (Gonzalez et al., 1998; Torres-Vega et al., 2000).

### D/ Cycle réplcatif

*In vivo*, le rotavirus a un tropisme pour les entérocytes différenciés de l'intestin grêle. Curieusement, l'infection de cellules présentées comme proches des entérocytes (cellules Caco, HT29) n'est pas très efficace et peu productive. Aussi, la plupart des travaux sur le rotavirus utilise des cellules MA104, issues de reins embryonnaires de singes rhésus (*Macaca mulatta*), pour cultiver le virus (Figure 30).

**Figure 30 : Le cycle du rotavirus.**

Les différentes étapes du cycle viral sont représentées : l'entrée suivie de la décapsidation, la transcription et la traduction des ARNm, la réplication et l'assemblage virale puis l'acquisition de la couche externe lors du bourgeonnement dans le réticulum endoplasmique et enfin la sortie du virus (Trask et al., 2012).



### 1/ Entrée et décapsidation

Le mécanisme d'entrée du rotavirus a longtemps été sujet à controverse : l'entrée par endocytose permet de tenir compte d'un grand nombre d'observations alors que l'entrée directe pose plus de questions. Le scénario suivant peut être dégagé.

Lors de l'infection, le clivage de VP4 en deux fragments VP5 et VP8 permet l'attachement du virus à la cellule via des glycoconjugués présents dans la membrane plasmique (Dormitzer et al., 2002; Haselhorst et al., 2009; Isa et al., 2006; Kraschnefski et al., 2009). Plusieurs intégrines ( $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 7$ ,  $\alpha 5\beta 10$ ,  $\alpha 10\beta 2$ ...) ont aussi été identifiées comme point d'arrimage en interagissant avec VP4 ou VP7 (Graham et al., 2003; Graham et al., 2006; Zarate et al., 2004).

Suite à l'attachement à la cellule, VP8\* se sépare de la particule, induisant un changement de conformation du fragment VP5\*. Ce changement de conformation met en avant un domaine hydrophobe de VP5 capable d'interagir avec la membrane plasmique de la cellule cible, et de la

déstabiliser provoquant la formation d'une vésicule d'endocytose et l'entrée de la particule (Figure 24) (Trask et al., 2010; Yoder and Dormitzer, 2006; Yoder et al., 2009). La protéine VP7 serait nécessaire pour stabiliser cette étape de perméabilisation de la membrane par VP5. (Chemello et al., 2002; Settembre et al., 2011; Wolf et al., 2011).

L'endocytose de la particule virale est suivie de la dissociation de VP7 de la particule, provoqué par la baisse en  $\text{Ca}^{2+}$  au sein de l'endosome, ion nécessaire au maintien de la forme trimérique de VP7 sur la particule virale (Figure 26). Deux phénomènes sont alors observés :

- La dissociation de VP7 de la particule induit un changement de conformation de VP6, permettant l'activation transcriptionnelle de la particule DLP (Feng et al., 2002; Thouvenin et al., 2001).
- des peptides, générés par la dégradation par la trypsine des VP7 dissociées de la particules, perméabiliserait la membrane de l'endosome libérant la DLP dans le cytoplasme (Charpilienne et al., 1997; Elaid et al., 2014).

### 2/ Transcription et traduction

Les DLP, transcriptionnellement actives, vont produire des ARN viraux de polarité positive (notés « ARNm ») coiffés en 5' mais non polyadénylés en 3'. Des canaux traversant les différentes couches protéiques de la DLP vont permettre la sortie de ces ARNm de la particule virale au fur et à mesure de leur synthèse par la polymérase VP1. Les ARNm viraux produits, coiffés en 5' par la guanylyl/méthyltransférase VP3, sont destinés soit à la traduction, soit à la réplication (Estes and Kapikian, 2007; Imai et al., 1983; Pizarro et al., 1991; Vasquez et al., 1993). Les ARNm destinés à la traduction vont être pris en charge par les différents facteurs impliqués dans la traduction, dont la protéine virale NSP3 : les détails mécanistiques de la traduction lors de l'infection par le rotavirus sont présentés plus loin (Voir p77).

### 3/ Réplication et assemblage viral

Les viroplasmes, compartiments viraux formés sous l'action de NSP2 et NSP5 vont permettre le rassemblement des différents acteurs pour l'étape de réplication et d'assemblage de nouveaux virions (Eichwald et al., 2012).

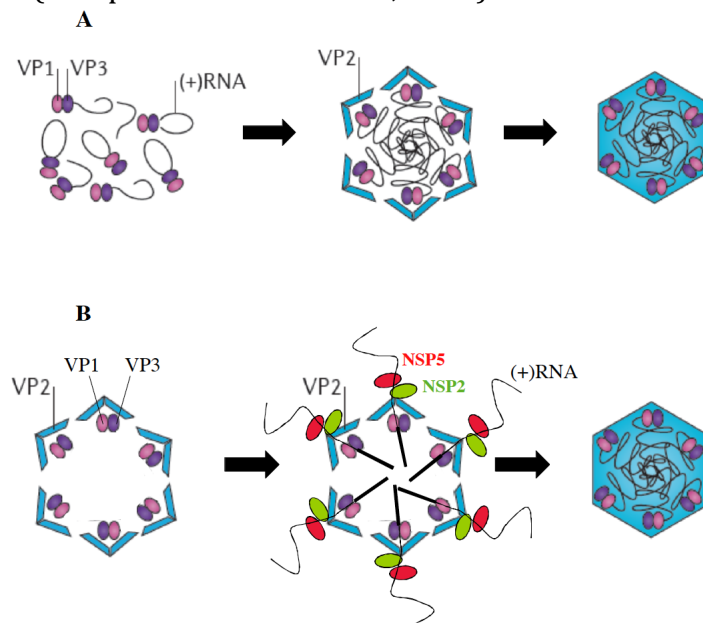
Le rotavirus réplique son génome en utilisant les ARNm comme matrice pour former les brins négatifs des ARNs. On ne sait pas si les ARNm ayant effectivement servi à la traduction peuvent aussi entrer dans le circuit « réplication » ou si deux lots bien distincts d'ARNm sont utilisés, l'un pour la réplication et l'autre pour la traduction. La polymérase VP1, de même que VP2, VP3, NSP2 et NSP5 sont impliquées dans cette étape (Cohen et al., 2002; Patton et al., 1997; Zeng et al., 1996) : VP1 reconnaît les ARNm via la partie UGUGA présente dans la séquence

consensus UGUGACC retrouvée en 3' (Tortorici et al., 2003). Il a été montré *in vitro* que la présence de VP2 est nécessaire pour induire la réplication, alors que la présence de VP3 stimule un peu plus l'activité réplicase de VP1 (Patton et al., 1997; Zeng et al., 1996).

J. Patton a proposé un modèle où les 11 segments, sous forme d'ARN simple brins positifs, sont pris en charge par VP1 et VP3. Ces 11 complexes sont alors rassemblés, et la protéine du core VP2 s'assemblerait autour de ces complexes pour former un pré-core. La formation de ce pré-core stimulerait alors l'activité réplicase de VP1 ce qui induirait alors la réplication des 11 gènes et la formation d'un core proprement dit (McDonald and Patton, 2011; Patton et al., 1997; Trask et al., 2012). Ce modèle présente l'avantage de permettre une étape de sélection des ARN par reconnaissance mutuelle des séquences ou structures secondaires des ARNm : l'ensemble des 11 ARNm faisant alors une structure unique « ondécamérique » (Figure 31A). Néanmoins, ce modèle ne permet pas de rendre compte de l'extrême condensation des ARNs dans la particule virale. Un autre modèle existe où les cores vides, composés de VP2, VP1 et VP3, seraient assemblés puis NSP2 et NSP5 permettraient de diriger les ARN viraux dans le core qui seraient alors simultanément répliqués et encapsidés (Figure 31B) (Taraporewala and Patton, 2004).

**Figure 31 : Modèle de réplication et d'assemblage des particules de rotavirus.**

(A) Un modèle de réplication, conçu par J. Patton, propose que les ARN simples brins positifs sont pris en charge par VP1, et VP3. Onze de ces complexes (plus un sans ARN) seraient alors rassemblés par reconnaissance réciproque des onze ARNm et l'addition de pentamères de VP2 stimulerait alors l'activité réplicase de VP1. L'ajout d'autres dimères de VP2 permettrait ainsi la formation d'un core (Trask et al., 2012). (B) Un modèle alternatif propose que les cores vides d'ARN s'assemblent d'abord puis sont remplis par les ARNs au cours de la réplication des ARNm (Taraporewala and Patton, 2004).



La couche externe VP6 se forme ensuite autour du core pour former une nouvelle DLP. On peut penser que cet assemblage est effectué grâce à la capacité de VP6 à s'assembler spontanément avec VP2 comme cela a été montré *in vitro* (Lepault et al., 2001; Mathieu et al., 2001). Les protéines NSP5 et NSP2, en plus de permettre la formation des viroplasmies, seraient des régulateurs empêchant la formation spontanée de particules virales vides de tout génome (Berois et al., 2003; Vente et al., 2003). Les nouvelles DLP peuvent soit former de nouveaux virions complets en acquérant la couche protéique externe (VP4+VP7), soit rentrer dans un nouveau cycle de transcriptions (dite transcription secondaire) (Silvestri et al., 2004).

### 4/ Acquisition de la couche externe et sortie du virus

Les DLP néoformées « migrent » ensuite au niveau du Reticulum Endoplasmique (RE) afin d'y acquérir la couche protéique externe. Grâce à l'interaction entre la protéine VP6 et la glycoprotéine NSP4, ancrée dans la membrane du RE (Petrie et al., 1984), la DLP va bourgeonner dans la lumière du RE et acquérir une enveloppe transitoire composée de NSP4 et de la membrane du RE (Figure 32) (Au et al., 1989; Lopez et al., 2005).

VP7, qui est aussi synthétisée et présente dans la lumière du RE, interagit avec NSP4 et s'assemblerait sur les DLP au cours de leur bourgeonnement dans le RE. Par la suite et d'une façon qui reste très floue, la particule virale perd l'enveloppe transitoire et NSP4 (Lopez et al., 2005; Maruri-Avidal et al., 2008; Ruiz et al., 2007; Tian et al., 1996).

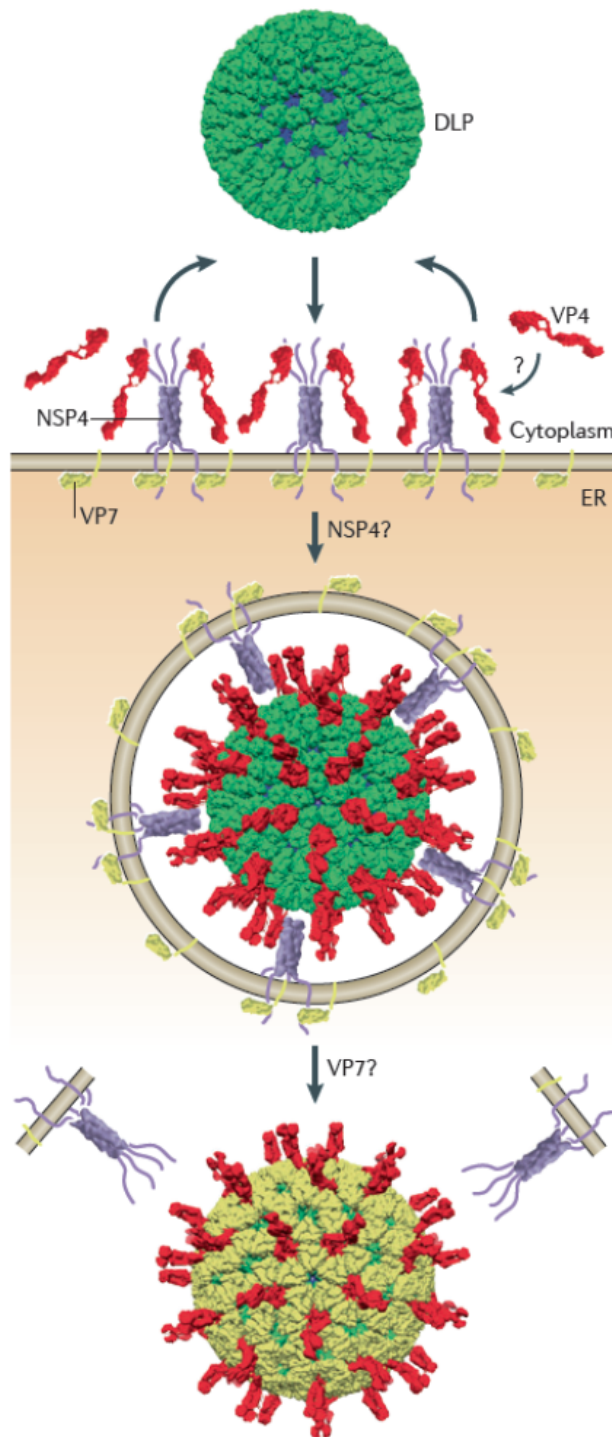
Deux modèles décrivent le recrutement de l'autre protéine composant la couche externe de capsid, VP4 : l'un propose que celle-ci est présente sur la face cytoplasmique du RE et qu'elle est acquise lors du bourgeonnement, tandis que l'autre modèle préconise le recrutement de VP4 en dehors du RE, au niveau de la membrane plasmique bien après la perte de l'enveloppe transitoire (Dector et al., 2002; Gonzalez et al., 2000; Trask and Dormitzer, 2006). Ce dernier modèle s'appuie sur l'observation de la présence de molécules de VP4 au niveau des rafts de la membrane cytoplasmique qui pourraient alors servir de point d'assemblage de la couche externe (Delmas et al., 2007; Delmas et al., 2004; Sapin et al., 2002).

Mais ce modèle se heurte malgré tout à l'observation que l'addition *in vitro* des protéines recombinantes VP4 et VP7 sur les DLP ne peut se faire que dans l'ordre VP4 puis VP7 (Shaw et al., 1993). L'assemblage préalable de VP7 sur les DLP bloque donc l'addition ultérieure de VP4 et ne permet pas de rendre les DLP infectieuses. De plus, la structure cristallographique des particules de rotavirus montre que VP7 recouvre les pieds de VP4 en interaction avec VP6 (Shaw et al., 1993; Yeager et al., 1994).



**Figure 32 : L'acquisition de la couche externe de la particule virale.**

Suite à l'assemblage de VP6 sur le core virale, les DLP néoformées sont soit impliquées dans les étapes de transcription secondaire, soit dirigées vers le Reticulum Endoplasmique (RE) afin d'y acquérir la couche externe. Via l'interaction entre VP6 et NSP4, la particule bourgeonne au sein du RE et la glycoprotéine VP7 s'assemble autour de la particule. Dans le cas de VP4, celle-ci s'assemblerait soit au niveau du RE lors du bourgeonnement de la particule, comme représenté ici, soit au niveau de la membrane plasmique lors de la sortie du virus (Trask et al., 2012).



Suite à l'assemblage de la couche externe, les nouveaux virions sont libérés de la cellule : aucun mécanisme de sortie du virus n'a été clairement défini pour le moment. Eventuellement, la lyse cellulaire peut constituer une méthode de libération massive de virus (Brunet et al., 2000; Musalem and Espejo, 1985; Tian et al., 1996). Dans le cas d'un épithélium entérocytaire, le virus a été caractérisé comme étant capable de sortir de la cellule via un trafic vésiculaire particulier sans lyse cellulaire (Delmas et al., 2004; Jourdan et al., 1997). Ce trafic vésiculaire pourrait impliquer les rafts qui, comme cela a été décrit précédemment, pourraient constituer un point d'assemblage de VP4, et donc pourrait aussi constituer un point de sortie pour le virus (Gardet et al., 2006; Gardet et al., 2007).

## II/ La protéine NSP3 du rotavirus

NSP3 est une des protéines virales dites non structurales du rotavirus. Identifiée à l'origine comme étant impliquée dans la traduction des ARNm viraux et dans l'inhibition de la traduction des ARNm de la cellule hôte, le rôle de NSP3 dans la traduction a été ces dernières années contesté (Montero et al., 2006; Rubio et al., 2013). Dans cette partie, nous présenterons les différents travaux qui ont permis de caractériser la protéine NSP3, ses fonctions, ses structures et l'état actuel des connaissances vis à vis de la traduction.

### A/ Généralités

NSP3, ou NS34 sous l'ancienne nomenclature (Non Structural 34kDa) a été identifiée, à partir de la séquence nucléotidique du gène 7, comme une protéine acide (Both et al., 1984; Estes and Cohen, 1989).

Par la suite, des expériences de fractionnement de lysat de cellules infectées sur gradient de césium et/ou de glycérol ont permis de montrer l'association de NSP3 avec des complexes contenant une activité réplicase (Gallegos and Patton, 1989; Patton and Gallegos, 1988).

L'étude de NSP3 dans des cellules d'insectes, dans les cellules MA104 infectées par le rotavirus ou dans un système de traduction *in vitro* ont permis de définir une région basique comme étant capable de lier les ARN. De plus, ces expériences ont aussi permis de déterminer un domaine d'interaction impliqué dans l'oligomérisation de NSP3 (Mattion et al., 1992).

En 1993, des expériences de pontage par rayonnements ultraviolets de cellules infectées par le rotavirus puis, après immunoprécipitation, de marquage et de séquençage des acides nucléiques liés à NSP3, ont permis de montrer qu'au cours de l'infection NSP3 est fixée à l'extrémité 3' des onze ARN de rotavirus (Poncet et al., 1993), le pontage se faisant sur le nucléotide le plus en 3'. D'autres expériences à partir de protéines recombinantes ont montré que NSP3 se fixe par sa partie



N terminale de manière spécifique à la séquence GACC retrouvée à l'extrémité 3' des ARN de rotavirus (Poncet et al., 1993). L'hypothèse d'un rôle de NSP3 dans la sélection des ARN de rotavirus pour leur réplication (ou leur transport vers les viroplasmes) a alors été émise.

### **B/ NSP3 : premières évidences de l'implication de NSP3 dans la traduction**

#### **1/ Caractérisation des domaines fonctionnels de NSP3**

En 1998, Piron *et al.* ont montré, par des expériences de double hybride et de coimmunoprécipitation à partir de cellules infectées, que NSP3 interagissait avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4G1 (Piron et al., 1998). Cette interaction est repérable dès 3h post infection et implique la partie C terminale de NSP3. En parallèle, une diminution de l'interaction par immunoprécipitation entre eIF4G et la PABP en cellules infectées ainsi qu'une baisse de la synthèse des protéines cellulaires marquées radioactivement au cours de l'infection sont observées. De fait, ces travaux ont posé le modèle de l'implication de NSP3 dans la traduction : NSP3 est une protéine capable de lier les ARNm de rotavirus via la séquence consensus GACC à l'extrémité 3' (Poncet et al., 1993), et peut lier le facteur eIF4G via un domaine en partie C terminale. Le remplacement de la PABP par NSP3 provoquerait la diminution de la traduction des ARNm polyadénylés. Les ARNm de rotavirus étant coiffés en 5' (Imai et al., 1983), NSP3 serait alors un facteur qui pourrait promouvoir la traduction des ARNm de rotavirus en recrutant les complexes d'initiation de la traduction pour les ARNm viraux : en effet, d'autres facteurs d'initiation de la traduction en plus de eIF4G sont précipités avec NSP3, comme eIF4A ou eIF4E (Piron et al., 1998) et eIF3 (Poncet D, Résultats non publiés). Ces résultats ont été ensuite reproduits *in vitro* : des lysats de réticulocyte de lapin complétés par un lysat ou extrait de cellules Hela non traitées aux nucléases (permettant de dégrader les ARN endogènes) ont été additionnés de différentes quantités de la protéine NSP3 recombinante tronquée comprenant juste le domaine de liaison à eIF4G (acides aminés 163 à 313). De nouveau, plus la quantité de NSP3 recombinante ajoutée est importante, plus son interaction avec eIF4G est marquée et, à l'inverse, plus l'interaction entre eIF4G et la PABP est diminuée. Cette diminution est aussi corrélée avec une diminution de la traduction des ARNm poly(A) issue du lysat de cellules Hela (Michel et al., 2000). Enfin, la surexpression, par un système vaccine recombinante, de la partie de dimérisation et de liaison à eIF4G permet d'inhiber la synthèse des protéines cellulaires en cellules de mammifères (Padilla-Noriega et al., 2002).

En 1999, Piron *et al.* ont ensuite défini les différents domaines qui composent NSP3 : par différentes expériences de test de liaison à l'ARN (retard de migration sur gel, pontage aux UV) de

double hybride et de prédiction de domaines structuraux, NSP3 a été découpée en 3 domaines. La partie N terminale allant de l'acide aminé 1 à 178 a été définie comme domaine de liaison à l'ARN, la partie entre 178 et 250 a été prédite comme domaine « coiled-coil » de dimérisation de NSP3, enfin la partie C terminale, allant des acides aminés 206 à 313, correspond au domaine d'interaction avec eIF4G (Piron et al., 1999). La possibilité d'observer les différentes interactions à partir de protéines NSP3 plus ou moins tronquées signifie que les domaines de liaison à l'ARN et à eIF4G sont fonctionnellement et structuralement indépendants, par contre, tous deux nécessitent au moins une partie du domaine de dimérisation.

### 2/ Implication de NSP3 dans la traduction virale

Plus tard, des tests de traduction d'ARNm rapporteurs transfectés en cellules exprimant NSP3 ou traduit dans un système *in vitro* ont montré l'impact de NSP3 dans la traduction des ARNm de rotavirus (Vende et al., 2000). Dans un premier temps, les auteurs ont transfectés des ARN rapporteurs codant la Firefly luciférase. Coiffés en 5', et ayant une extrémité 3' se finissant soit par la séquence consensus des ARNm de rotavirus de groupe A (UGUGACC) reconnue par NSP3, soit par une séquence non reconnue par NSP3 (AAUU), ou par une extrémité polyadénylée. Ces ARNm ont été transfectés dans une lignée de cellules de testicules de porcs ou dans un clone de ces cellules exprimant constitutivement la protéine NSP3. L'expression de NSP3 permet d'augmenter d'un facteur 7 l'activité luciférase issue de l'ARN de type rotavirus.

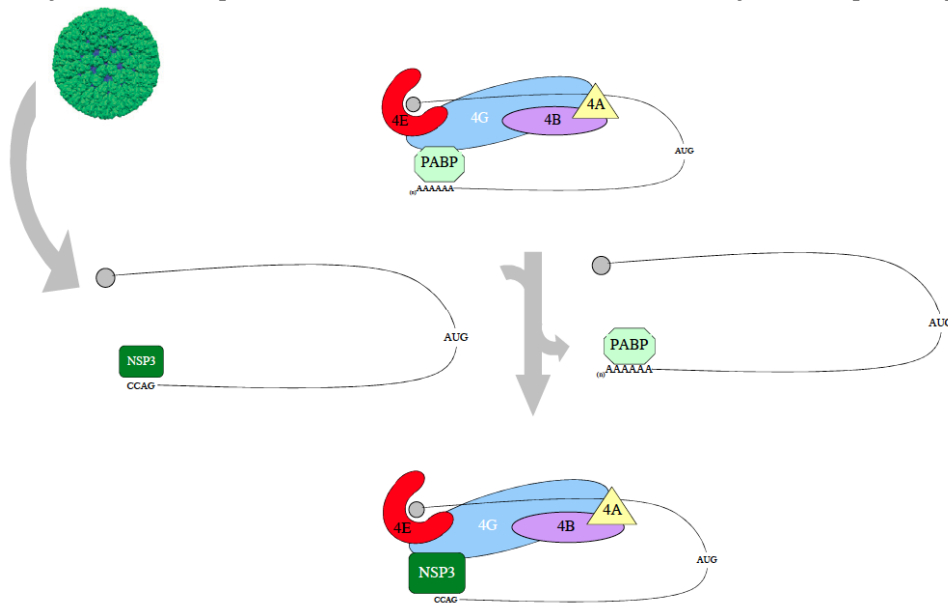
De manière surprenante, les expériences de traduction *in vitro* montrent que la présence de NSP3 stimule aussi, dans une moindre mesure que l'ARN de type rotavirus, la traduction des ARNm de type non rotavirus ou polyadénylés. Cette stimulation est aussi observée à partir d'ARNm non coiffés. Une explication possible est que le lot de NSP3 purifiée n'est pas homogène : issue d'une purification en condition dénaturante puis suivie d'une renaturation *in vitro*, il se peut que certaines molécules de NSP3 mal repliées soient capables de lier les ARNm de manière non spécifique.

Des expériences complémentaires *in vitro* ont permis ensuite de montrer que la délétion de la partie de NSP3 liant le facteur eIF4G diminue l'effet stimulateur de NSP3 d'environ 100 fois. Des ARNm synthétisés *in vitro* (de type rotavirus, non rotavirus ou poly(A) en 3') sont traduits dans un lysat de reticulocyte de lapin traité à la nucléase micrococcale qui a été supplémenté en protéines NSP3 recombinantes (sauvage ou mutée). Des mutations ponctuelles du domaine de liaison à l'ARN de NSP3 diminuent l'activité du rapporteur de type rotavirus de 2 à 10 fois selon les mutations. Si l'ensemble du domaine de liaison à l'ARN est délété, aucune stimulation de la

traduction n'est observée. Des expériences de fixation de NSP3 sur l'ARN ont permis de montrer qu'un mutant peut encore fixer partiellement l'ARN de type rotavirus (détectable par pontage UV mais pas par gel retard) expliquant la faible baisse de stimulation d'un des mutants de liaison à l'ARN. L'ensemble de ces travaux fournissent une première évidence de l'implication de NSP3 dans la traduction des ARNm de rotavirus (Figure 33).

### Figure 33 : Premier modèle de la traduction des ARNm de rotavirus et des ARNm polyadénylés au cours de l'infection par le rotavirus.

Lors de l'infection, des ARNm de rotavirus et des protéines virales NSP3 sont synthétisés. Ceux-ci vont prendre la place des ARNm cellulaires et de la PABP au sein du complexe eIF4F permettant la synthèse des protéines virales, et l'inhibition de la synthèse protéique cellulaire.

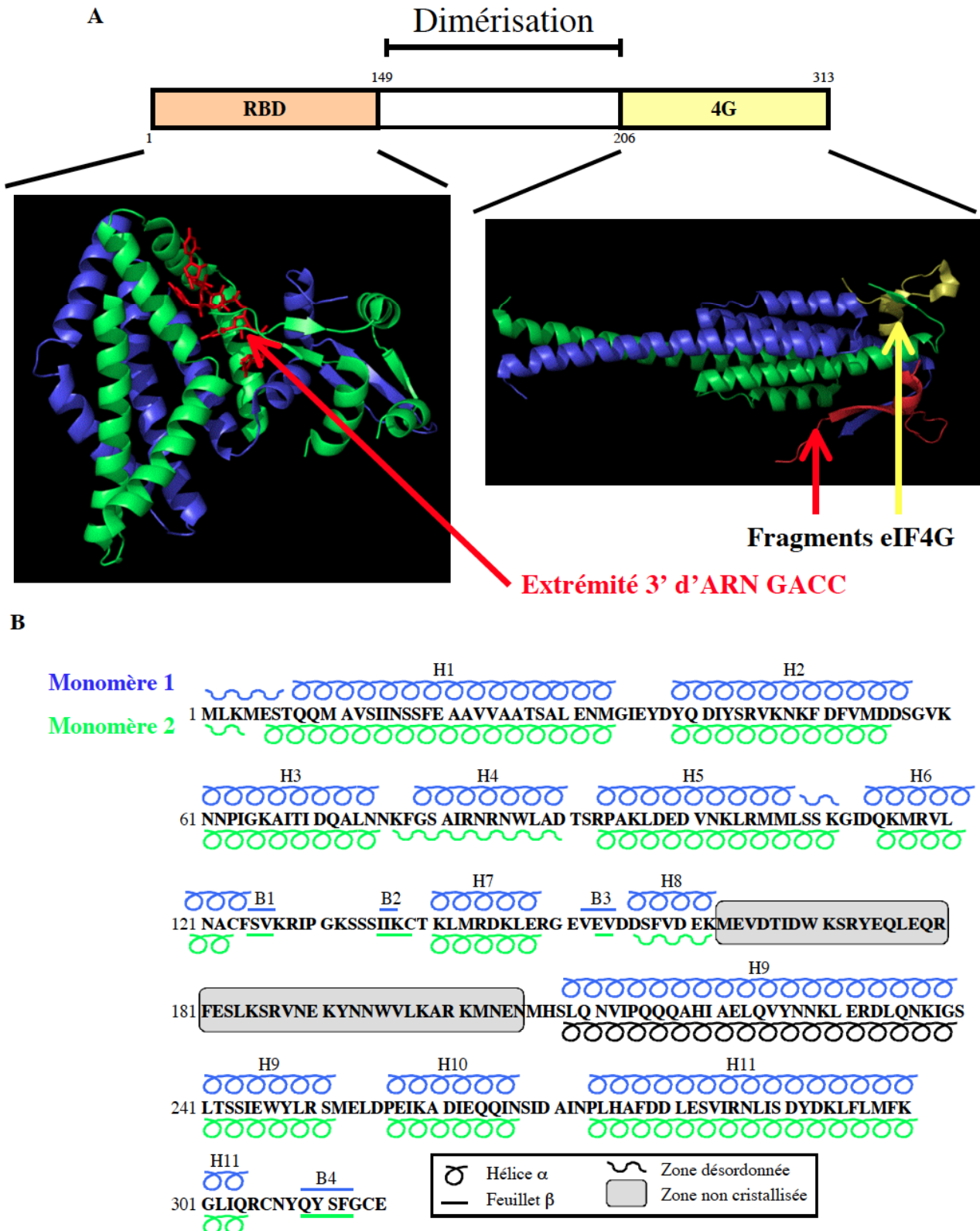


### 3/ Structures de NSP3

Parallèlement à ces différents tests d'activité de NSP3, les structures des domaines de liaison à l'ARN (Deo et al., 2002) et à eIF4G (Groft and Burley, 2002) de NSP3 ont été déterminées séparément. Dans les deux cas, une organisation en homodimères est observée (Figure 34).

**Figure 34 : Représentation des structures cristallographique des domaines de liaison à l'ARN ou à eIF4G de NSP3.**

(A) Structures cristallographiques du domaine de liaison à l'ARN de NSP3 (4-164) associé à un ARN GUGACC, et du domaine de liaison à eIF4G (206-315) lié à un fragment d'eIF4G humain (132-160). (B) Les acides aminés impliqués dans des structures secondaires ont été indiqués sur la séquence de NSP3 (Deo et al., 2002; Groft and Burley, 2002).



La structure du domaine de liaison à l'ARN (acides aminés 4 à 164), en complexe avec un ARN GUGACC, permet de voir une forme dimérique asymétrique avec la formation d'un tunnel dans lequel la séquence GACC de l'ARN est insérée. Le tunnel étant fermé, la protéine ne peut reconnaître la séquence GACC que si elle est placée à l'extrémité 3' de l'ARN. L'addition d'un seul nucléotide en 3' ne permettant plus la reconnaissance des autres bases en empêchant leur entrée dans le tunnel (Poncet et al., 1994). De plus, la structure permet de mettre en évidence que seuls les nucléotides GACC de la séquence UGUGACC sont en contact avec la protéine. Cette observation a été appuyée par la mesure d'une affinité similaire du domaine de liaison à l'ARNm de NSP3 pour les séquences UGUGACC, UGACC ou GACC. L'interaction avec l'ARN permet de stabiliser la structure de NSP3 comme l'indiquent des expériences de dénaturation thermique de la protéine seule ou en complexe avec l'ARN. Par contre, aucun contact avec un ARN se finissant par GAC ou ACC n'a pu être observé. Parallèlement, aucune compétition n'a été observée lors de l'ajout d'un ARNm polyadénylé (Deo et al., 2002).

Par la suite, une autre étude a déterminé la structure de la partie C terminale de NSP3 de souche SA11 en complexe avec un peptide correspondant à la région 132-160 d'eIF4G1 (Groft and Burley, 2002). Cette partie de NSP3 se présente aussi sous forme d'homodimères (Figure 34). Du fait de cette dimérisation, deux sites de liaison à eIF4G1 sont possibles. Bien qu'il soit supposé qu'une seule molécule d'eIF4G1 puisse interagir avec NSP3 *in vivo* compte tenu de l'encombrement stérique du complexe d'initiation, aucune évidence expérimentale n'existe pour le démontrer. La présence de deux complexes eIF4F par dimère de NSP3 (et donc par molécule ARN) est à mettre en parallèle avec les complexes ARN poly(A) et PABP. En effet, la taille moyenne (150 à 200 nucléotides) des queues poly(A) des ARN polyadénylés peut s'accommoder de plusieurs dimères de PABP (chaque dimère couvrant 25 nucléotides) et donc d'autant de complexes eIF4F. De plus, on peut aussi supposer que les dimères de NSP3 qui n'auraient pas fixé d'ARN puissent, en fixant deux molécules d'eIF4G1, évincer deux molécules de PABP des complexes d'initiation.

Ces sites de liaison à eIF4G sont conservés sur les protéines NSP3 au sein du groupe A de rotavirus signifiant que le mécanisme de recrutement d'eIF4G est similaire entre les souches de rotavirus appartenant à ce groupe. Malgré une assez grande divergence de séquence dans la partie C terminale, l'interaction NSP3 de groupe C avec eIF4G1 a aussi été détectée en double hybride (Piron et al., 1998). Par contre, l'existence d'un domaine de liaison à eIF4G1, au sein de la protéine NSP3 de groupe D, est plus douteuse. La PABP et NSP3 partage le même site de fixation sur eIF4G (Imataka et al., 1998; Piron et al., 1998). La mutation des acides aminés d'eIF4G impliqués dans des interactions critiques avec NSP3 a aussi un effet sur la fixation avec la PABP (Groft and Burley, 2002). De manière intéressante, des expériences par titration calorimétrique isotherme ont permis de

montrer que NSP3 (souche SA11) fixe plus fortement eIF4G1 que la PABP (respectivement Kd de 10-50nM pour NSP3 contre 27μM pour la PABP) : cette affinité plus forte pour eIF4G permet au virus de détourner plus facilement eIF4F à son profit et cela malgré le plus faible nombre de molécule de NSP3 (un dimère de NSP3 par ARN) en comparaison à la PABP (Groft and Burley, 2002). Il faut noter que la région d'interaction d'eIF4G1 (132-160) avec la PABP et avec NSP3 est très identique entre eIF4G1 et eIF4G2 : seule l'arginine 135 est changée en lysine. NSP3 interagit aussi avec cette région d'eIF4G2 dans un test de double hybride (Poncet, résultats non publiés).

Le domaine de fixation de la PABP à eIF4G se fait sur la face opposée du site de fixation de la PABP à l'ARN (RRM 1 et 2) (Deo et al., 1999; Gray et al., 2000; Groft and Burley, 2002). Récemment, il a été montré que la fixation de l'ARN sur la PABP favorise son interaction avec eIF4G et que la fixation de la PABP sur eIF4G favorise l'interaction avec l'extrémité poly(A) par un phénomène d'allostérie coopérative (Safaei et al., 2012). Ce phénomène, qui n'existe vraisemblablement pas pour NSP3 pour laquelle les deux domaines de liaison à l'ARN et à eIF4G sont physiquement distincts, permettrait donc de s'assurer que la fixation de la PABP à eIF4G ne se fasse pas en l'absence d'ARN. A l'inverse, l'éviction de la PABP d'eIF4G par NSP3 conduirait au détachement de l'ARN poly(A) de la PABP. Ces études structurales ont permis de mieux comprendre le rôle de NSP3 dans la traduction des ARNm viraux, et dans l'inhibition de la traduction des ARNm cellulaires.

#### *4/ Un cofacteur cellulaire de NSP3 : RoXaN*

##### *a/ Identification et caractérisation du facteur*

Enfin une dernière étude a permis la découverte d'un autre facteur associé à NSP3 et aux facteurs impliqués dans la traduction. Ce facteur, baptisé « RoXaN » (X protéine associated with Rotavirus NSP3), a été découvert lors du même crible en double hybride qui a permis l'identification d'eIF4G comme partenaire de NSP3. En cellules MA104 non infectées, la protéine RoXaN est retrouvée en partie dans le noyau de la cellule et dans le cytoplasme (Harb et al., 2008) indiquant que RoXaN pourrait posséder des séquences de localisation (NLS) et d'export (NES) nucléaire. Lors de l'infection par le rotavirus, la concentration de RoXaN dans le noyau diminue. Il existe deux gènes homologues dans le génome humain (ZC3H7B et ZC3H7A, RoXaN I et II) et des homologues sont retrouvés au sein de différents règnes animaux comme les mammifères, les poissons, les oiseaux, chez les invertébrés mais semblent restreintes aux Chordés. Les prédictions de motifs et de structures effectuées sur les protéines codées par ces deux gènes, indiquent la présence dans la partie N terminale de 2 à 3 motifs TPR (tétratricopeptides) et dans la partie C terminales de 4 à 8 motifs à doigt de zinc de type (C3H ou C2H2). Ces deux grands domaines de

RoXaN sont séparés par une région prédites comme peu structurée et peu conservée entre RoXaN I et II sauf au niveau d'un court motif « LD » riche en leucine et aspartate. C'est sur ce domaine LD que se fait l'interaction entre NSP3 et RoXaN I. Les domaines d'interaction entre NSP3 et RoXaN I ont été définis par double hybride : ce facteur interagit au niveau du domaine de dimérisation de NSP3 (acides aminés 163 à 240). Aucune interaction entre NSP3 et RoXaN II n'a pu être détectée ni en double hybride ni en co-immunoprécipitation (Vitour, 2004). Il a été montré que le site LD d'interaction entre NSP3 et RoXaN I pouvait agir comme un signal d'export nucléaire (NES) lorsqu'il est fusionné à une protéine nucléaire. Par contre, aucune expérience de transfection de fragment de RoXaN I n'a permis d'identifier de séquence signale NLS (Becker M. Résultats non publiés).

Par immunoprécipitation, non seulement, il a été observé que RoXaN I interagit avec NSP3, mais en plus, du fait de l'interaction entre NSP3 et eIF4G, un complexe à trois partenaires NSP3/RoXaN/eIF4G a été mis en évidence par immunoprécipitation et double hybride « sandwich » (Vitour et al., 2004). Une expérience d'immunoprécipitation après pontage aux UV a permis de montrer que RoXaN et la PABP interagissent par l'intermédiaire d'ARN (Vitour, 2004).

### *b/ Relocalisation nucléaire de la PABP au cours de l'infection par le rotavirus*

Par des observations de microscopie à fluorescence, il a été montré que l'infection par le rotavirus induit la relocalisation de la PABP vers le noyau (Harb et al., 2008). La relocalisation nucléaire de la PABP peut être induite par la surexpression de NSP3 seule, mais n'est pas observée par la surexpression d'un mutant de NSP3 de liaison à eIF4G ou de liaison à RoXaN (Harb et al., 2008).

L'ensemble de ces résultats a permis d'émettre l'hypothèse que RoXaN I servirait à l'export des ARN poly(A) et donc des molécules de PABP qui leur sont associées. Le décrochage de la PABP d'eIF4G provoqué par la fixation de NSP3 aurait aussi pour conséquence d'affaiblir la liaison de la PABP sur l'extrémité poly(A) ; les molécules de PABP, qui ne sont plus fixées à un ARN seraient alors libres de retourner dans le noyau. Aucune séquence NLS consensus n'a été définie sur la PABP et sa relocalisation vers le noyau dépend de son interaction avec eIF4G (Afonina et al., 1998; Harb et al., 2008). La région de liaison à l'ARN de la PABP, étant riche en résidus basiques, pourrait alors servir, en absence d'ARN, de signal de localisation nucléaire (NLS).

NSP3 en interagissant avec le domaine LD de RoXaN séquestre cette dernière dans le cytoplasme, et ainsi, empêche l'export de la PABP et des ARNm qui lui sont associés. Si cette hypothèse est séduisante et permet d'expliquer le blocage de l'export des ARN poly(A) lors de l'infection par le rotavirus récemment décrit (Rubio et al., 2013), elle se heurte toutefois à



l'observation que l'export de protéine par la séquence LD est bloquée par un traitement des cellules avec la leptomycine B (LMB) qui inhibe la voie d'export nucléaire dépendante des exportines (Kudo et al., 1998). Par contre, dans les cellules de mammifères, la majorité des ARNm ne sont pas exportés du noyau par cette voie mais via les voies TAP/p15 insensible au LMB (Braun et al., 2001). Il faut alors imaginer que la protéine RoXaN sans ARN est exportée via la voie des exportines alors que les complexes ARN poly(A)/PABP/RoXaN sont exportés via la voie TAP/p15.

### C/ Remise en cause de l'implication de NSP3 dans la traduction

#### 1/ « NSP3 n'est pas utile à la traduction virale » ; Expérience de siRNA contre le gène 7

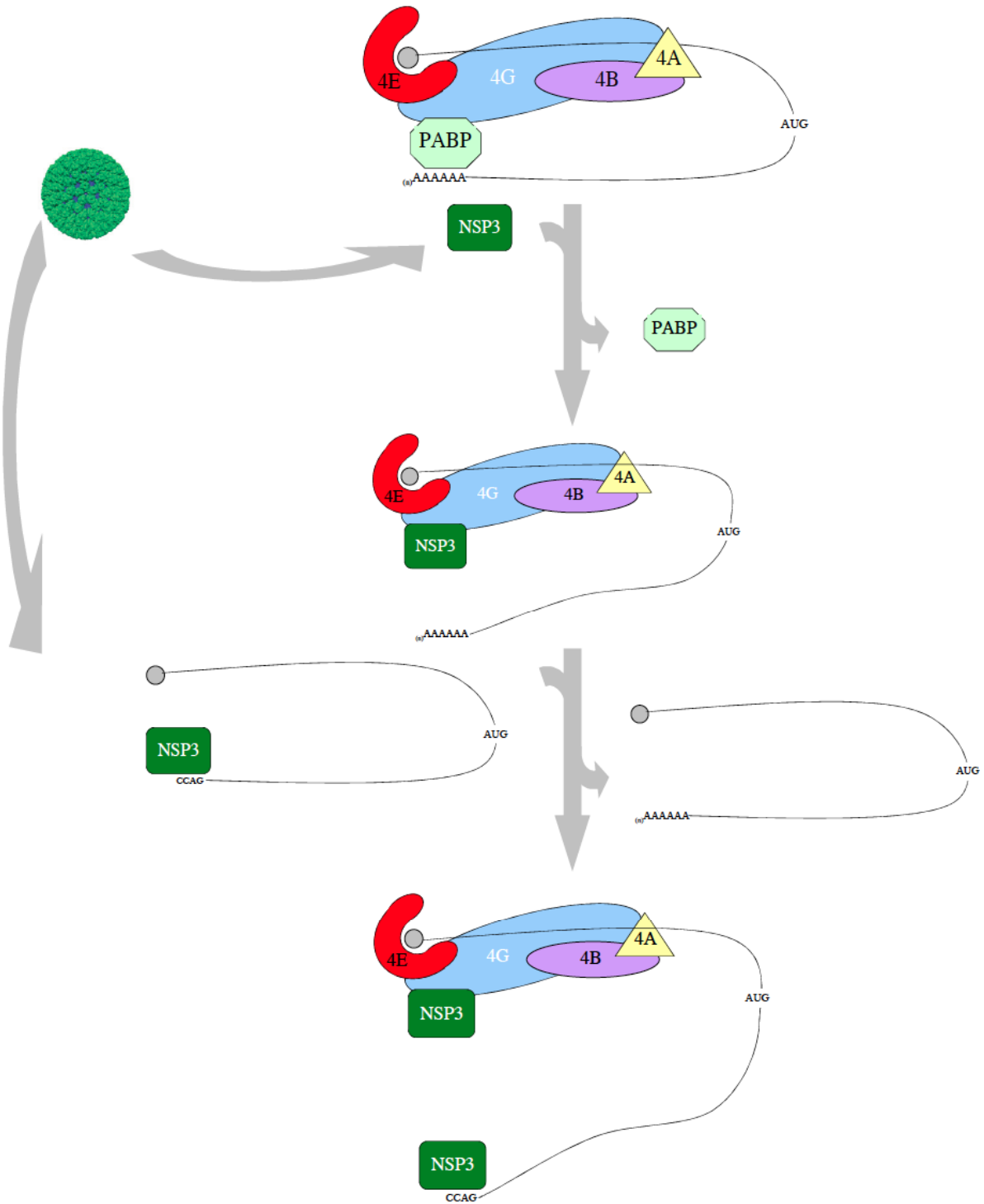
En 2006, le rôle de NSP3 dans la traduction des ARN du rotavirus a été remis en cause (Montero et al., 2006). Des expériences de « silençage » par ARNi ont montré que, lors d'une infection des cellules MA104 par la souche RRV (Rhesus Rotavirus), si l'expression de NSP3 est supprimée ou diminuée, cela n'affecte pas l'expression des autres protéines virales (Montero et al., 2006). Pour cela, différents paramètres ont été observés : outre l'absence d'impact de la diminution de la quantité de NSP3 sur les autres protéines virales, les auteurs montrent que la diminution de NSP3 augmente les quantités d'ARNm viraux et d'ARN double brins. Le titre viral est aussi augmenté, par contre l'effet cytopathique est diminué. Enfin, la traduction des ARN cellulaires est rétablie lorsque la quantité de NSP3 est diminuée.

Les auteurs proposent que les deux fonctions de NSP3 (fixation à l'ARN et l'interaction avec eIF4G) ne sont pas reliées fonctionnellement ; la fixation à l'ARN servant à protéger les ARN viraux de la dégradation alors que l'interaction avec eIF4G sert à l'inhibition des synthèses des protéines cellulaires (Figure 35). De plus, NSP3 pourrait aussi servir de régulateur à la réplication, en rendant accessible ou non l'extrémité 3' des ARN viraux aux complexes de réplication. Lors de la diminution de NSP3 par le siRNA, les ARN viraux seraient plus accessibles aux complexes de réplication ce qui expliquerait l'augmentation des ARN double brins et du titre viral et, par augmentation de la transcription secondaire, des ARNm viraux.



**Figure 35 : Modèle alternatif de traduction des ARNm de rotavirus et des ARNm polyadénylés (D'après (Montero et al., 2006)).**

Lors de l'infection par le rotavirus, des ARNm viraux et la protéine NSP3 sont produits. La protéine NSP3 (sous forme de dimères et sans ARN viraux) permet l'éjection de la PABP des complexes eIF4F. D'autres dimères de NSP3 prennent en charge les ARNm viraux protégeant ces derniers de la dégradation. Les ARNm viraux prennent alors place au sein des complexes eIF4F. La liaison à l'ARN et la liaison à eIF4G seraient deux fonctions de NSP3 qui n'agiraient pas obligatoirement ensemble pour induire une traduction efficace des ARNm viraux. NSP3 permettrait la protection des ARNm viraux, l'inhibition de la traduction cellulaire et la régulation de l'étape de réplication.



Une autre objection de la validité du rôle de NSP3 dans la traduction des ARNm viraux a été que le système utilisé (Vende et al., 2000) pour démontrer ce rôle ne reflète pas l'infection virale : la protéine NSP3 étant soit ajoutée dans le système de traduction *in vitro* soit étant déjà présente dans les cellules exprimant NSP3 de façon constitutive, alors qu'au début de l'infection seuls les ARNm viraux sont présents car NSP3 n'est pas une protéine de structure du virus.

Bien qu'un effet de la diminution de NSP3 soit observable sur la synthèse des autres protéines virales (Figure 2 de Montero *et al.* (Montero et al., 2006)) aux premiers temps d'infections (2 à 4 heures post-infection), les auteurs ne relèvent pas cette observation. Il faut souligner aussi le fait que l'outil d'ARNi ne conduit qu'à une réduction de la synthèse du facteur ciblé et que des quantités peu importantes (non détectables par marquage métabolique ou immunobuvardage) de NSP3 pourraient être suffisante pour maintenir une traduction des ARN viraux.

Ce même genre d'expériences par ARNi ont été effectués au laboratoire en infectant les mêmes cellules par la souche SA11 du rotavirus. Contrairement à ce qui avait été montré par Montero *et al.*, la baisse de l'expression de NSP3 par ARNi affecte de façon transitoire l'expression des autres protéines virales (Résultats non publiés).

De plus, des expériences (menées au laboratoire, (Baron, 2008)) de cotransfection d'ARN de rotavirus synthétisés *in vitro* à partir d'ADN (le gène 7 codant la protéine NSP3 et gène 11 codant NSP5) ont permis de montrer que, d'une part, la synthèse de quelques molécules de NSP3 à partir du gène 7 est suffisante pour stimuler en trans la traduction d'un autre gène de rotavirus (gène 11).

### 2/ Virus réarrangé sur le gène 7

En 2012, Arnold *et al.* ont étudié un virus mutant disposant d'un gène 7 réarrangé (Arnold et al., 2012). Ce gène code pour une protéine NSP3m correspondant presque à la fusion de deux protéines NSP3. NSP3m comporte deux domaines complets de liaison à l'ARN, deux domaines de dimérisation et d'un domaine de liaison à eIF4G. Dans ces travaux, les auteurs montrent que, lors d'une cinétique d'infection, le titre viral de ce virus mutant évolue de manière semblable à un virus sauvage. En outre, les auteurs ont étudié sur ce mutant les différentes caractéristiques connues de NSP3 : ainsi, cette protéine NSP3m peut dimériser et peut lier eIF4G (avec une affinité moindre) ainsi que le facteur RoXaN. La liaison aux ARNm viraux n'a pas été directement vérifiée, par contre, le domaine N terminale de liaison à l'ARN étant intact, il devrait être fonctionnel. Ces observations sont à mettre en corrélation avec le fait que la PABP n'est pas relocalisée au noyau des cellules infectées par le virus mutant, et que la traduction des ARNm polyadénylés n'est plus inhibée. Du fait de cette duplication, NSP3m serait moins apte à lier eIF4G et donc d'évincer la PABP du complexe eIF4F et finalement moins capable d'induire sa relocalisation vers le noyau. Le

virus mutant se répliquant, d'après le titre viral, à la même vitesse qu'un virus sauvage, les auteurs concluent que NSP3 ne serait donc pas utile à la réplication et/ou à la traduction tout du moins dans des lignées de cellules permettant la culture du virus (Arnold et al., 2012).

Cette dernière conclusion est discutable dans le sens où la protéine NSP3m conserve, bien qu'affaiblie, toutes les caractéristiques de NSP3 : NSP3m peut encore être suffisante pour induire la traduction des ARNm viraux.

### *3/ NSP3 et l'inhibition de l'export des ARNm cellulaires*

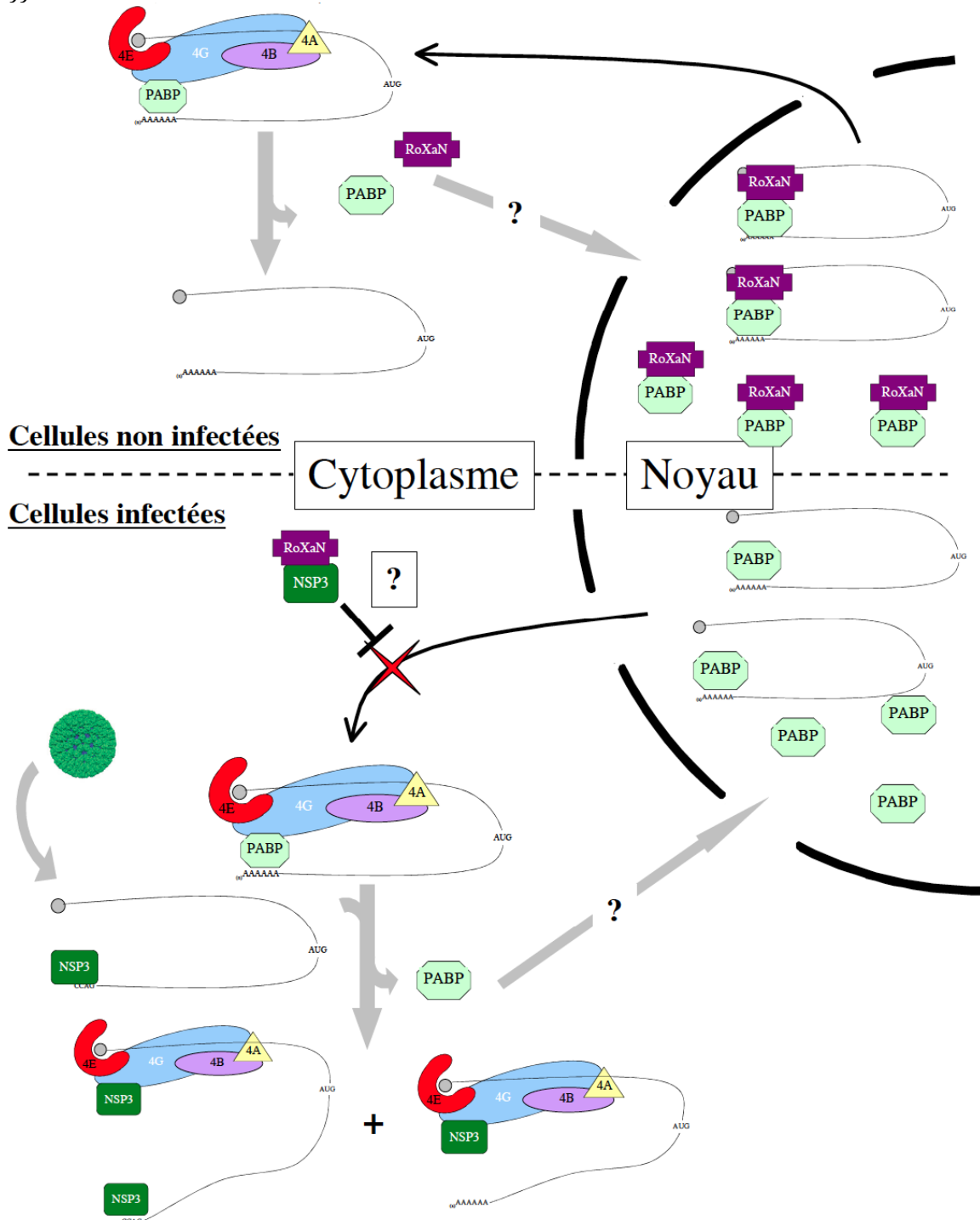
Récemment, une publication (Rubio et al., 2013) est parue remettant en cause le rôle de l'éviction de la PABP des complexes eIF4F dans l'inhibition de la traduction des ARNm polyadénylés cellulaires. Dans cette étude, les auteurs montrent que l'infection par le rotavirus n'induit pas de blocage de la traduction des ARNm poly(A) lorsque ceux-ci sont directement introduit dans le cytoplasme par lipofection. Par contre, l'inhibition de la traduction par l'infection est effective pour les ARNm poly(A) synthétisés dans le noyau après transfection de plasmide d'expression. L'inhibition de la traduction dépendante de la PABP par l'infection virale serait liée à un blocage de l'export des ARNm cellulaires plutôt qu'à l'éviction de la PABP d'eIF4F.

L'inhibition de l'expression de NSP3 par ARNi permet de montrer que cette dernière est responsable de l'inhibition de l'export des ARNm cellulaires. Outre ces tests d'activités avec des ARN rapporteurs, les auteurs ont étudié la quantité de différents ARNm cellulaires au sein du noyau ou du cytoplasme de la cellule. De nouveau, une augmentation de la quantité d'ARNm poly(A) cellulaires dans le noyau est observée. Les auteurs postulent pour un mécanisme d'inhibition de la traduction cellulaire dépendant de NSP3 qui bloquerait l'export des ARNm cellulaires, mais n'interviendrait pas au niveau traductionnel (Rubio et al., 2013). Ce mécanisme serait lié à la relocalisation de la PABP vers le noyau ainsi que l'hyperadénylation des ARNm au sein du noyau et a d'ailleurs été décrit avec d'autres virus (Kumar and Glaunsinger, 2010).

En conclusion, pour ces auteurs ces différents travaux remettent en cause le modèle proposé initialement. NSP3 n'aurait aucun rôle dans la traduction des ARNm viraux, mais jouerait d'une part dans la protection des ARNm viraux des systèmes de dégradation cellulaires, et d'autre part comme régulateur de l'accessibilité des ARN aux complexes de réplication viraux. En parallèle, NSP3 aurait un rôle dans l'inhibition de la traduction cellulaire, en forçant la relocalisation de la PABP vers le noyau et en bloquant l'export des ARNm cellulaires au sein du noyau (Figure 36).

**Figure 36 : Modèle de traduction des ARNm cellulaires et viraux et d'inhibition de l'export des ARNm cellulaires.**

Ce modèle reprend les différents modèles de Harb *et al.* ainsi que Rubio *et al.* vis-à-vis de l'inhibition de l'export des ARNm cellulaires avec potentiellement la séquestration de RoXaN par NSP3. Le modèle de traduction des ARNm viraux par NSP3 de Montero *et al.* a été ajouté où les liaisons à l'ARNm viral et à eIF4G n'auraient pas besoin d'être effectuées simultanément pour induire une bonne traduction des ARNm viraux. De plus, les ARNm polyadénylés encore présent dans le cytoplasme seraient toujours pris en charge par le complexe eIF4F selon le modèle proposé par Rubio *et al.* (D'après (Harb et al., 2008; Montero et al., 2006; Rubio et al., 2013)).



### D/ Autres propriétés associées à la protéine NSP3

Outre ces études qui ont permis de caractériser l'implication de NSP3 dans les étapes de traduction, virales ou cellulaires ; d'autres travaux ont permis de montrer que cette protéine est impliquée dans d'autres voies plus ou moins indépendantes.

#### 1/ NSP3 et virulence

Des études ont permis de montrer que la protéine NSP3 est un déterminant important de la virulence, notamment pour la multiplication du virus en dehors de l'intestin. Des virus réassortants issus de la co-infection des virus de souches SA11 (incapable de se répliquer en dehors de l'intestin) et RRV (capable de se disséminer en dehors de l'intestin) dans des souris ont été isolés de différents organes, caractérisés, puis testés pour leur capacité à se répliquer dans l'intestin, mais aussi dans d'autres organes comme le foie. Une analyse statistique de ces résultats montre que le gène 7 (codant NSP3) de la souche RRV est fortement lié à la capacité des réassortants à se multiplier en dehors de l'intestin ((Mossel and Ramig, 2002, 2003)).

La base moléculaire de ce mécanisme n'est pas connue mais des résultats récents du laboratoire indiquent que les extrémités 3' des gènes 7 (codant NSP3) des souches SA11 et RRV ne sont pas identiques. Le gène 7 de la souche SA11 se termine par la séquence GGCC qui est moins bien reconnue *in vitro* par NSP3 que la séquence GACC présente en 3' du gène 7 de la souche RRV. Une hypothèse pour cette différence de phénotype selon la souche serait que ces différences dans l'extrémité 3' des ARN viraux codant NSP3, régule le niveau et/ou la cinétique d'expression de NSP3 qui en retour détermine la quantité de protéines virales et *in fine* de virus produits. Une grande quantité de NSP3 permettant alors une réplication virale détectable à partir de cellules où le virus se réplique mal.

Enfin, outre ce rôle lors de la traduction, NSP3 en liant l'extrémité 3' des ARN viraux, pourrait protéger ces derniers des systèmes de défenses cellulaires innés pouvant reconnaître la présence de pathogènes, notamment via les acides nucléiques. Des effecteurs comme les TLR, RIGI, MDA5 ou bien PKR sont en effet capables de reconnaître des motifs spécifiques de pathogènes (ARN double brins, extrémité 3' triphosphate (non coiffée)) et d'induire une réponse antivirale (Broquet et al., 2010). Cependant, une voie de réponse antivirale induite par la reconnaissance d'ARN non polyadénylés dans le cytoplasme demande encore à être décrite. Par contre, il existe des systèmes de dégradation des ARN non polyadénylés, dont l'action sur les ARNm de rotavirus pourrait être bloquée par NSP3.

## 2/ NSP3, eIF2 et réponse UPR

En 2008, des travaux de Montero *et al.* ont montré que l'infection par le rotavirus de souche RRV induit la phosphorylation de la sous unité eIF2 $\alpha$ . En parallèle, les auteurs montrent que l'infection empêche la formation des granules de stress, des compartiments cytoplasmiques induits lors de stress. Cependant, bien que les facteurs responsables de ces observations soient NSP2, NSP5 et VP2 (déterminés par silençage par ARNi), il est intéressant de voir que le virus induit un système d'inhibition de la traduction cellulaire, sans que cela n'affecte la traduction de ses propres ARN (Montero *et al.*, 2008). L'infection par le rotavirus provoque la réponse aux protéines mal conformées (UPR) et celle-ci est bloquée par la protéine NSP3 : les auteurs montrent que différents gènes impliqués dans la réponse UPR sont induits, mais les ARNm correspondant ne sont pas traduits à cause de l'action de NSP3 (Trujillo-Alonso *et al.*, 2011).

## Interaction entre Hsp90 et NSP3

Dutta *et al.* ont montré que la protéine chaperonne cellulaire Hsp90 interagit avec NSP3 au cours de sa synthèse (Dutta *et al.*, 2011). Hsp90 interagit au niveau du domaine de liaison à eIF4G de NSP3. Les auteurs montrent que l'inhibition d'Hsp90 déstabilise NSP3 qui est alors dégradée par la voie du protéasome. La liaison à l'ARN, la dimérisation, et la liaison à eIF4G sont favorisées en présence d'Hsp90. De plus, l'inhibition de l'interaction entre Hsp90 et NSP3 supprime la relocalisation de la PABP vers le noyau. De fait, les auteurs proposent qu'Hsp90 aiderait NSP3 à se conformer correctement lors de sa synthèse (Dutta *et al.*, 2011).

## 3/ Mutations thermosensibles de NSP3

Dans les années 1980, des mutants thermosensibles de rotavirus ont été isolés, en particulier avec le virus SA11 par l'équipe de F. Ramig (Gombold *et al.*, 1985; Gombold and Ramig, 1987; Ramig, 1982). Ces mutants ts ont été classés en groupes de complémentation. Deux virus appartenant à des groupes de complémentations différents infectant une même cellule, produisent une progénie virale en partie de phénotype sauvage. En effet, la nature segmentée du génome des *reoviridae* implique que les virus réassortants présentent une mosaïque de gènes issue des deux parents ; si les mutations ts sont sur des gènes différents alors une partie (théoriquement 1/4) de la progénie virale aura la version non mutée de chaque gène et sera de phénotype sauvage. A l'inverse, si les mutations ts sont sur le même gène alors elles ne pourront pas se compléter et seront alors placées dans le même groupe de complémentation.

L'analyse de ces mutants ts a permis d'identifier 10 groupes de complémentations pour les 11 gènes du rotavirus. Par des méthodes de croisements avec des virus sauvages dont la migration électrophorétique des ARNdb peut être différenciée de celle des virus mutants, 6 de ces groupes ont

pu être assignés à un gène particulier (par exemple le virus « prototype » du groupe tsE présente une mutation dans le gène 8 codant la protéine NSP2) (Taraporewala et al., 2002). Aucun de ces 6 groupes ne correspond au gène 7 codant NSP3.

Le laboratoire a entrepris le séquençage des gènes 7 des groupes D, H, I et J restants à identifier. Deux groupes (H et I) présentent des mutations entraînant une modification d'un acide aminé de NSP3. Les deux mutations sont situées dans la partie de NSP3 fixant l'ARN. Dans le cas du mutant tsH, deux mutations ont été caractérisées l'une dans NSP3 (G131/R) est un changement important sur un résidu en contact avec l'ARN, et l'autre dans le gène codant VP3 (Y97C) pouvant conférer ou accentuer le caractère thermosensible du mutant tsH. Dans le cas du mutant tsI, une mutation sur NSP3 (A95G) ne se situant pas sur un acide aminé directement en contact avec l'ARN a été identifiée. Cette mutation change, à l'intérieur d'une hélice  $\alpha$  en contact avec l'ARN, un acide aminé favorable à la formation d'hélice  $\alpha$  par un résidu défavorable. Récemment, il a été montré que les mutations H et I sur NSP3 induisent une moins bonne interaction entre NSP3 et l'ARN viral à température élevée (cf publication en annexe, (Vende et al., 2013)).

### III/ But du travail : quantification de l'effet de NSP3 sur la traduction des ARN de rotavirus

Les observations citées plus haut ; mutants ts de NSP3, rôle de NSP3 et des extrémités 3' dans la virulence du virus, sensibilité variable des souches de rotavirus à l'ARNi dirigés contre NSP3, traduction initiale de l'ARN codant NSP3 ; nécessitent, pour être étudiées, de pouvoir quantifier l'effet de NSP3 et des mutants de NSP3 sur la traduction des ARN viraux et non viraux. Dans ce travail, des ARN de rotavirus ou des ARN « pseudo rotaviraux » ont été utilisés. Ces ARN sont obtenus *in vitro* par transcription en présence d'analogues de la coiffe et sont en tout point identiques aux ARN produits à partir de DLP virales avec pour exception l'ORF pouvant coder pour une protéine dont l'activité est quantifiable par mesure de l'activité luciférase. Des ARN rapporteurs non rotavirus ou polyadénylés ont été synthétisés de la même manière.

Dans un premier temps, le but de mon travail de thèse a donc été d'étudier la traduction d'ARN rapporteurs, avec des extrémités de type rotavirus (Rota), non rotavirus (Nona) ou polyadénylés (poly(A)), introduits dans des cellules infectées par le rotavirus, puis ensuite dans une lignée de cellules exprimant la protéine NSP3 seule. Ceci a notamment permis de montrer l'effet qu'a l'infection par le rotavirus sur la traduction des différents ARN rapporteurs.

Dans un deuxième temps, j'ai mis au point un système cellulaire quantitatif permettant de mesurer la part des différents domaines de NSP3 et des ARN rapporteurs dans l'augmentation de la traduction : ce système a notamment été appliqué à l'étude de régions non codantes d'ARN de rotavirus. Enfin, l'effet de NSP3 sur la traduction de son propre ARN a été étudié par l'utilisation d'un ARN chimère permettant à la fois l'expression de NSP3 et la mesure de son activité.



## **Chapitre 2 : Matériels et méthodes**

### **I/ Constructions plasmidiques**

#### **A/ Préparations d'ADN plasmidiques**

##### **1/ Mini préparations**

Pour l'analyse rapide des clones bactériens, les plasmides, présents dans *E.coli* DH5 $\alpha$ , sont extraits par la méthode de la lyse alcaline (Birnboim and Doly, 1979). Par cette méthode, les plasmides, petits ADN circulaires libres, ne sont pas dénaturés ni précipités avec les protéines bactériennes, contrairement au long ADN génomique de la bactérie qui est attaché aux membranes. L'extraction est effectuée à partir d'une culture de bactéries à saturation (1,5ml). Après centrifugation à 15 000g pendant 1 min, le culot bactérien est remis en suspension dans 100 $\mu$ l de tampon I (25mM Tris-Hcl pH8 ; 10mM EDTA ; 50mM glucose), puis les bactéries sont lysées avec 200 $\mu$ l de solution II (0,2M NaOH ; 1% SDS), puis 150 $\mu$ l de solution III (3M acétate de potassium ; 1,8M acide formique). Le lysat est centrifugé à 15 000g pendant 15 minutes, puis la phase aqueuse est récupérée et l'ADN est précipité par addition de deux volumes d'éthanol froid (-20°C) et centrifugé à 15 000g pendant 5min. Un second lavage à l'éthanol 80% est effectué, puis le culot est séché à l'air libre. L'ADN est finalement repris dans une solution à 50 $\mu$ g/ ml de RNaseA.

##### **2/ Midi préparations**

Pour obtenir des préparations de plasmides pures utilisables en transcription *in vitro*, les plasmides d'intérêts sont purifiés à partir de 100mL de cultures en milieu LB ou TB, à l'aide du kit Nucleobond Xtra Midi (Macherey-Nagel) suivant les instructions du fournisseur. La purification est basée sur la méthode de la lyse alcaline (voir plus haut) et comprend une étape de fixation puis d'élution de l'ADN sur une résine échangeuse d'anions. La concentration d'ADN plasmidique est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre « Nanodrop » (Thermo Scientific) en considérant qu'une unité de densité optique à lambda 260nm correspond à une concentration de 40 $\mu$ g/ml d'ADN.

#### **B/ Digestion enzymatique et analyse en gel d'agarose**

Les ADN plasmidiques sont digérés par les enzymes de restriction adaptées. Les digestions sont faites pendant une heure à 37°C. Celles-ci sont vérifiées par migration de l'ADN dans un gel d'agarose 1% additionné de bromure d'éthidium (BET 0,1 $\mu$ g/ml final). La migration est effectuée à 130V pendant environ 30 minutes en tampon 1X TBE ou TAE, les ADN sont visualisés sous éclairage UV.

### C/ Purification sur gel

Les vecteurs et inserts d'intérêts sont préparés par digestion enzymatique. Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose 1%. Les bandes d'intérêt sont découpées et purifiées de l'agarose à l'aide du kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel). Les extractions sont vérifiées par électrophorèse dans un gel d'agarose 1% et la concentration d'ADN est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre « Nanodrop ».

### D/ Ligation et transformation

Les ligations sont effectuées dans un volume final de 25µl contenant la T4 DNA ligase, son tampon, et les ADN inserts et vecteurs (avec un ratio molaire de deux inserts pour un vecteur). Le mélange de ligation est incubé une nuit à 16°C. Les bactéries DH5α ou XL1-blue compétentes sont décongelées (25µl) et mises en contact avec 1µl de d'ADN à transformer puis incubées dans la glace pendant 30 min. Un choc thermique est ensuite effectué à 42°C pendant 45s, suivie de 2min dans la glace. 250µl de milieu SOC sont alors ajoutés et pour permettre l'expression du gène de résistance aux antibiotiques, les tubes sont agités (à 225rpm et 37°C) pendant 45min. 1/25° et le reste de chaque culture sont ensuite étalées sur milieu gélosé en boîtes de Petri avec l'antibiotique approprié (ampiciline : 100µg/ml final ; carbénicilline : 50µg/ml ; kanamycine : 100µg/ml) et les boîtes sont mises à incuber 18h à 37°C. Les colonies sont repiquées à l'aide d'un cure-dent et mises dans 3ml de milieu LB avec l'antibiotique approprié et cultivées sous agitation à 180rpm à 37°C pendant 24h. L'ADN plasmidique est extrait par la méthode de la lyse alcaline.

### E/ Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée est effectuée par amplification par PCR du plasmide matrice à muter avec l'enzyme pfu turbo polymérase à l'aide de deux amorces complémentaires contenant la mutation (Quickchange, Stratagene). 1µl (10 unités) de l'enzyme Dpn1 est ensuite ajouté au produit de PCR et incubé 1h à 37°C. Les produits d'amplification sont alors utilisés pour transformer des bactéries compétentes *E.coli* XL1-blue. L'enzyme Dpn1 hydrolysant spécifiquement les ADN méthylés, seul l'ADN matrice produit en bactérie est dégradé, les plasmides amplifiés *in vitro*, non méthylés, et portant la mutation ne sont pas affectés et sont à l'origine des clones bactériens. Les constructions plasmidiques sont vérifiées par séquençage par la méthode de Sanger (entreprise GATC) ; soit seulement sur les jonctions des constructions lors de simples clonages, soit sur l'ensemble des parties amplifiées lors de clonage de produits de PCR, et sur l'ensemble de l'insert (hors squelette plasmidique) lors de mutagenèse dirigée ou de clonage d'oligonucléotides.

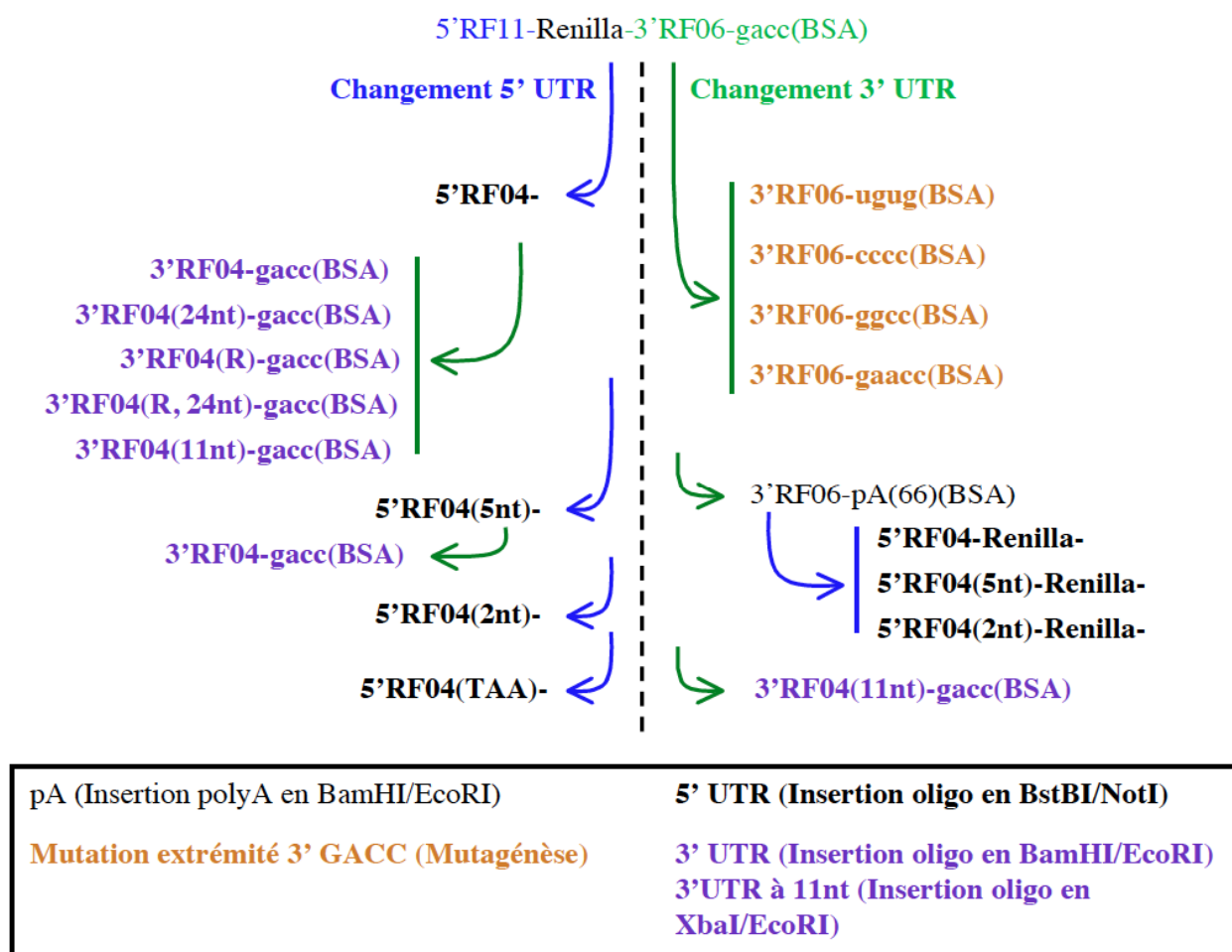
## F/ Constructions des plasmides « rapporteurs », « standard » et « d'expression de NSP3 »

### 1/ Plasmides utilisés pour la transcription des ARN utilisés comme rapporteurs.

La construction de base utilisée est priboz RF1106-renilla-Bsa, un plasmide ayant, sous contrôle du promoteur de la polymérase T7, la séquence codant la luciférase Renilla encadrée respectivement par la 5' et 3' UTR du gène 11 (codant NSP5) et 6 (codant VP6) issus du rotavirus de souche RF. L'extrémité 3' de la construction se terminent par GACC obtenue grâce à la digestion par l'enzyme de restriction Bsa1. Ce plasmide de référence a été modifié pour créer différentes constructions (Figure 37).

#### Figure 37 : Généalogie des plasmides codant les ARN rapporteurs Renilla.

La construction d'origine pT7-5'RF11-Renilla-3'RF06-gacc(Bsa) a été modifiée par mutagenèse ou par insertion d'oligonucléotides pour obtenir les différentes constructions utilisées dans les travaux présentés.



**a/ Mutagenèse de l'extrémité 3'**

Les rapporteurs comportant l'extrémité 3' GACC mutée en GGCC ou GAACC ont été obtenus par mutagenèse dirigée avec les oligonucléotides Nona1, Nona2, Nona GGCC et Nona GAACC respectivement (Figure 37, Tableau 6).

**Tableau 6 : Oligonucléotides utilisés pour les mutations des extrémités 3' des rapporteurs.**

Nom	Oligos	Description
<b>Nona 1 (UGUG)</b>	CGTAGTGAGAGGATGTGGAGACCGATGGCATCTCCACC (sens) GGTGGAGATGCCATCGGTCTCCACATCCTCTCACTACG (antisens)	Suppression de ACC de l'extrémité 3' GACC
<b>Nona 2 (CCCC)</b>	GCGTAGTGAGAGG <b>CCCC</b> GGAGACCGATGGCATCTCCAC (sens) GTGGAGATGCCATCGGTCTCCGGGGCCTCTCACTACGC (antisens)	Substitution de l'extrémité 3' UGUG de Nona1 par CCCC
<b>Nona GGCC</b>	GTGAGAGGATGTG <b>GG</b> CCGAGACCGATGGC (sens) GCCATCGGTCTCCGGCCACATCCTCTCAC (antisens)	Substitution de l'extrémité 3' GACC par GGCC
<b>Nona GAACC</b>	CGTAGTGAGAGGATGTGA <b>A</b> CCGAGACCGATGGCATC (sens) GATGCCATCGGTCTCCGGTTCACATCCTCTCACTACG (antisens)	Substitution de l'extrémité 3' GACC par GAACC

**b/ Echange des 5' et 3' UTR**

Sur le plasmide pT7-5'RF11-Renilla-3'RF06-gacc(Bsa), la 5'UTR de gène 11 a été substituée par la 5' UTR de gène 4, sauvage ou mutée, par insertion aux sites NotI et BstBI d'oligonucléotides complémentaires hybridés. La 3' UTR de gène 6 a été substituée par la même méthode aux sites BamHI et EcoRI. Dans le cas de la substitution du 3'UTR par une UTR de gène 4 dit « mini », l'insertion a été faite aux sites XbaI et EcoRI, ceci afin d'avoir la 3' UTR de gène 4 raccourci insérée directement en aval du codon STOP. Les oligonucléotides utilisés sont listés dans les tableaux 7 et 8.

**Tableau 7 : Oligonucléotides utilisés pour substituer la 5' UTR des rapporteurs.**

Nom	Oligos	Description
<b>RF04</b>	GGCCGCTAATACGACTCACTATAG <b>GGCTATAAA</b> ATGGCTT (sens) CGAAGCCATTTTATAGCCTATAGTGAGTCGTATTAGC (antisens)	5' UTR de gène 4 de rotavirus
<b>R04 5nt</b>	GGCCGCTAATACGACTCACTATAG <b>GGCAA</b> ATGGCTT (sens) CGAAGCCATTGCGCTATAGTGAGTCGTATTAGC (antisens)	5' UTR de gène 4 de rotavirus raccourci à 5 nucléotides
<b>RF04 2nt</b>	GGCCGCTAATACGACTCACTATAG <b>GG</b> ATGGCTT (sens) CGAAGCCATCCTATAGTGAGTCGTATTAGC (antisens)	5' UTR de gène 4 de rotavirus raccourci à 2 nucléotides
<b>RF04 STOP</b>	GGCCGCTAATACGACTCACTATAG <b>GGCTATAAA</b> <b>TAA</b> GCTT (sens) CGAAGCTTATTTATAGCCTATAGTGAGTCGTATTAGC (antisens)	5' UTR de gène 4 de rotavirus suivi d'un codon STOP au lieu d'AUG
<b>RF04 no kozak par</b>	GGCCGCTAATACGACTCACTATAG <b>GGCTATAAA</b> ATG <b>T</b> CTT (sens) CGAAGACATTTTATAGCCTATAGTGAGTCGTATTAGC (antisens)	5' UTR de gène 4 de rotavirus avec mutation du nucléotide +4 autour de l'AUG
<b>RF04 no kozak tot</b>	GGCCGCTAATACGACTCACTATAG <b>GGCTATCAA</b> ATG <b>T</b> CTT (sens) CGAAGACATTTGATAGCCTATAGTGAGTCGTATTAGC (antisens)	5' UTR de gène 4 de rotavirus avec mutation des nucléotides -3 et +4 autour de l'AUG
<b>RF04 5nt nokozak</b>	GGCCGCTAATACGACTCACTATAG <b>GGCAA</b> ATG <b>T</b> CTT (sens) CGAAGACATTTGCGCTATAGTGAGTCGTATTAGC (antisens)	5' UTR de gène 4 de 5 nucléotides de rotavirus avec mutation du nucléotide +4 autour de l'AUG

**Tableau 8 : Oligonucléotides utilisés pour substituer la 3' UTR des rapporteurs.**

Nom	Oligos	Description
<b>RF04</b>	GATCCGCAACTGACAGAGGATGTGACCGGAGACCG (sens) AATTCGGTCTCCGGTCACATCCTCTGTCAGTTGCG (antisens)	3' UTR de gène 4 de rotavirus
<b>RF04 random</b>	GATCCCTGCGGAAAAATGGACTGGACCGGAGACCG (sens) AATTCGGTCTCCGGTCCAGTCCATTTTCCGCAGG (antisens)	3' UTR de gène 4 de rotavirus désordonné
<b>RF04 Short</b>	CTAGCAGAGGATGTGACCGGAGACCG (sens) AATTCGGTCTCCGGTCACATCCTCTG (antisens)	3' UTR de gène 4 de rotavirus raccourcis à 20 nucléotides
<b>RF04 Bermuda</b>	CTAGCTAGCAGAAAATGTGACCGGAGACCG (sens) AATTCGGTCTCCGGTCACATTTTCTGCTAG (antisens)	3' UTR de gène 4 de rotavirus désordonné raccourcis à 24 nucléotides
<b>RF04 mini</b>	CTAGTGACCGGAGACCG (sens) AATTCGGTCTCCGGTCA (antisens)	3' UTR de gène 4 de rotavirus raccourcis à 11 nucléotides

### c/ Polyadénylation des ARN rapporteurs

Afin d'obtenir un clone du 3' UTR du gène 6 polyadénylé, 16µg d'ARN de rotavirus double brins ont été incubés en présence de 1mM ATP, dans un tampon (50mM Tris-HCl pH 8.0, 250mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, avec 4U de *E coli* polyA polymérase (New England Biolabs)). Après 20min d'incubation à 37°C la réaction est purifiée avec une colonne « PCR purification kit » (Qiagen) suivant les instructions du fournisseur. Un cinquième du volume d'élution de la colonne (50µl) à été utilisé pour faire la transcription inverse (Invitrogen) avec l'oligonucléotide dT-BSA-Eco-UAP (Tableau 9) en suivant les instructions du fournisseur. L'extrémité 3' du gène 6 a été amplifiée par PCR à l'aide des amorces Forward Bam RF6 UTR3 et reverse UAP (Tableau 9) avec la Taq Polymérase Easy A (Agilent). Le produit de 250nt a été purifié sur gel (kit Mermaid,BIO101), cloné dans le vecteur pGEM-T et séquencé. Un clone, contenant 66 adénosines, en 3' a été sélectionné et utilisé pour substituer le fragment BamHI-EcoRI du 3' UTR du gène 6 dans le priboz 5'RF11-Renilla-RF06-gacc(Bsa) (Figure 37).

**Tableau 9 : Oligonucléotides utilisés durant le protocole de polyadénylation des ARN rapporteurs.**

Nom	Oligos (Sens)	Description
<b>Oligodt BSA Eco UAP</b>	CCGGTGCGCAGCTGATCATGgaattcGGTCTCTTTTTTTTTTTTTTTT	Amorce ayant servi pour la transcription inverse des ARN polyadénylés
<b>Bam RF6 UTR3</b>	ATGATCGGATCCTgaggaccaagctaaccattgg (Forward) GGCCACGCGTCGACTAGTAC (Reverse)	Amorces ayant permis l'amplification des transcriptions inverses des ARN polyadénylés

### 2/ Plasmides utilisés pour la transcription des ARN utilisés comme standards de transfection.

Les plasmides utilisés pour la transcription des ARN standards EMCV-Fluc ont été obtenus par insertion de la séquence de l'IRES EMCV en NotI-NcoI dans le plasmide contenant la luciférase Firefly sous contrôle de la polymérase T7. Les standards EMCV-Rluc et EMCV-Cluc ont été obtenus par substitution de la séquence codant la luciférase Firefly (Promega) par les séquences codant les luciférase Renilla ou Cypridina obtenues des vecteurs pRL (Promega) et pCluc basic (New England Biolabs) en NcoI-XbaI.

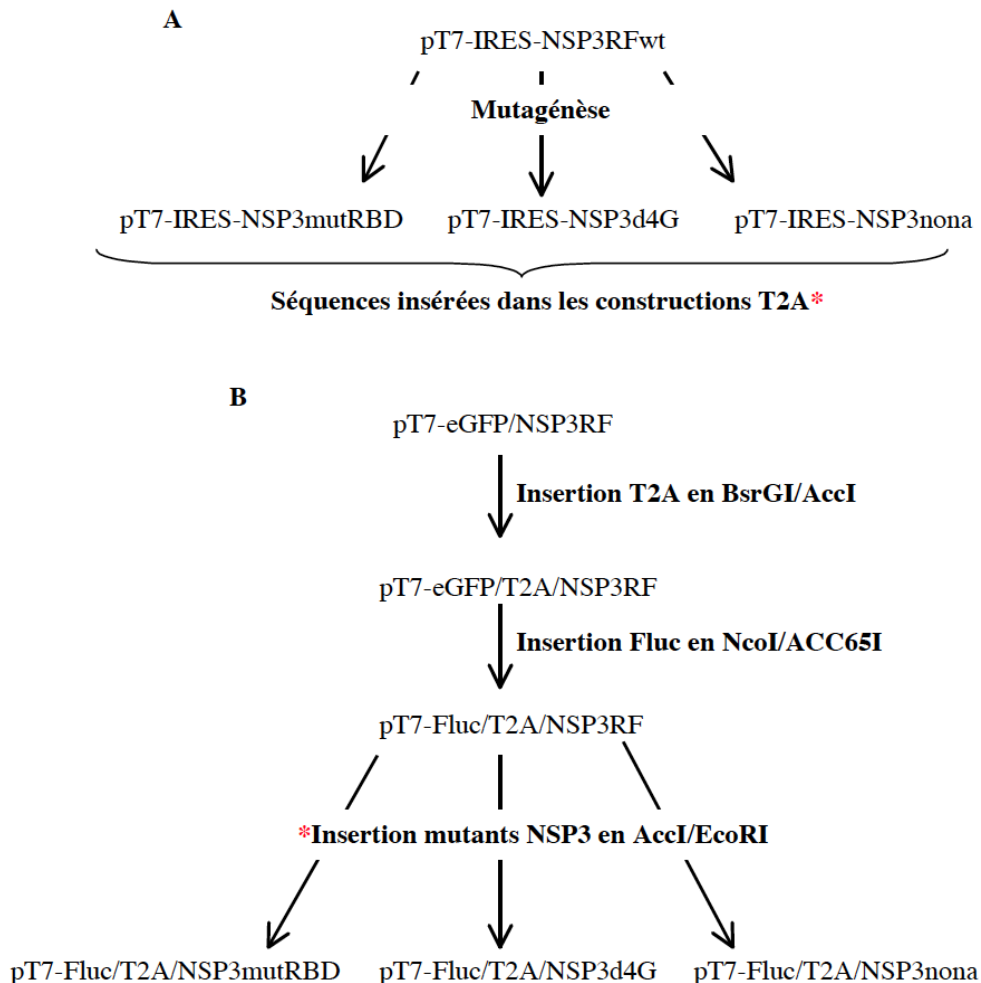
### 3/ Plasmides utilisés pour l'expression de NSP3 wt et mutées

Les vecteurs d'expression, de NSP3 mutées, ont été obtenus en mutant le plasmide de référence pT7-IRES-NSP3wt par mutagenèse dirigée avec les oligonucléotides indiqués (Figure 38, Tableau 10).

Les constructions « T2A » ont été obtenues par insertion d'oligonucléotides (Figure 38, Tableau 10) codant la séquence T2A entre les séquences codantes de l'eGFP et de NSP3 RF en BsrGI-AccI dans le plasmide pT7-eGFP/NSP3RF. La séquence codante de l'eGFP a ensuite été substituée par celle de la luciférase Firefly (issue de pGL3, Promega) en NcoI-Acc65I dans le plasmide pT7-eGFP/T2A/NSP3RF ouvert par NcoI-KpnI. Enfin, la séquence codante de NSP3 sauvage a été remplacée par les séquences mutantes par substitution du fragment AccI-EcoRI purifié à partir des plasmides pT7-IRES-NSP3-mutant (cf. ci-dessus).

#### **Figure 38 : Généalogie des plasmides codant NSP3.**

**(A)** La construction d'origine pT7-IRES-NSP3RFwt a été modifiée par mutagenèse dirigée pour obtenir les différentes constructions codant NSP3 mutées. **(B)** Les constructions « T2A » ont été obtenues à partir de la construction d'origine pT7-eGFPNSP3RFwt modifiée par insertion de la séquence T2A, de la séquence luciférase Firefly puis des séquences codant NSP3 mutées.





**Tableau 10 : Oligonucléotides utilisés pour muter NSP3 RF et insérer la séquence T2A dans les constructions.**

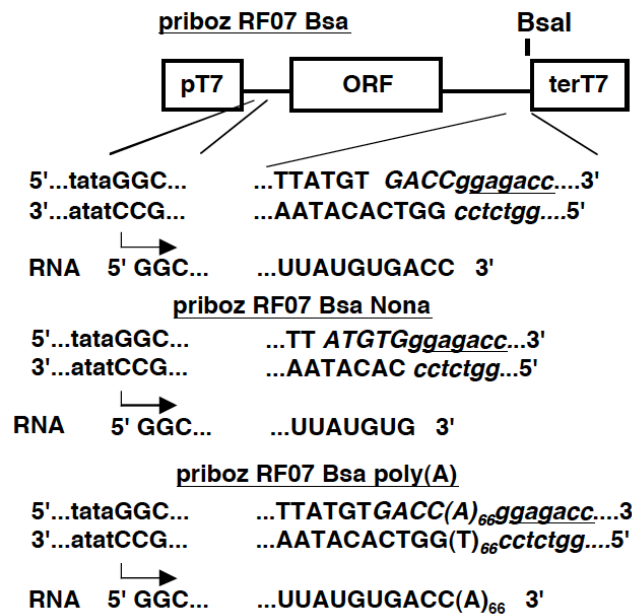
Nom	Oligo	Description
<b>mutRBD</b>	ATTTGGTTCAGCAGCAGCTGCTAGAAATTGGATGGCTGA (sens) TCAGCCATCCAATTTCTAGCAGCTGCTGCTGAACCAAAT (antisens)	Mutation d'acides aminés RN en AA (83-84) dans le domaine de liaison à l'ARN de NSP3
<b>d4G</b>	GAATGGTACCTGAAATGATAGCAATTGCCTGATG (sens) CATCAGGCAATTGCTATCATTTTCAGGTACCATTC (antisens)	Introduction d'un codon STOP en position 251 dans le domaine de liaison à eIF4G de NSP3
<b>Nona</b>	CTATAGGGGCGTTATGTGGAGACCGATGGCATCTCCACC (sens) GGTGGAGATGCCATCGGTCTCCACATAACGCCCCATAG (antisens)	Suppression de l'extrémité 3' GACC
<b>Oligos "T2A"</b>	GTACAAGGAAGCCGGGGAAGCCTGCTGACCTGCGGGGACGTGGAG GAAAACCCCGGACCAATGGAGT (Sens) agACTCCATTGGTCCGGGGTTTTCCTCCACGTCCCCGAGGTCAGCAGG CTCCCCGGCCTTCCTT (Antisens)	Oligos insérés en BsrGI/AccI entre les séquences de l'eGFP et de NSP3

## II/ Synthèse d'ARN *in vitro*

### A/ Préparation et purification des matrices

15µg de plasmides, contenant les séquences à transcrire, sont linéarisés par digestion par l'enzyme de restriction appropriée (BsaI pour les ARN rapporteurs, EcoRI pour l'ARN standard EMCV). Après contrôle de la digestion, les ADN sont ensuite purifiés à l'aide de colonne Wizard DNA clean-up (Promega) (Figure 39).

**Figure 39 : Représentation de la préparation des ARN se terminant par une séquence Rota (GACC) ou Nona (UGUG) ou polyadénylée de rotavirus à l'aide d'une digestion par l'enzyme de restriction BsaI.**



### B/ Transcription, purification et quantification des ARN

Les ARN coiffés sont produits par transcription *in vitro* par la polymérase T7 à partir de matrices d'ADN linéarisées. Le kit de transcription Ambion mMessage mMachine ULTRA a été utilisé suivant le protocole du fournisseur. Le mélange de transcription contient un analogue de la coiffe m7G(5')ppp(5')G des ARNm (anti-reverse cap analog (ARCA)) qui est incorporé par la T7

polymérase en 5' des transcrits. Les transcriptions sont effectuées pendant deux heures à 37°C dans un volume final de 10µl. 0,5µl de Turbo DNase sont ensuite ajoutés pour dégrader la matrice ADN pendant 15 minutes à 37°C. Les ARN non coiffés sont synthétisés à l'aide du kit MEGAscript (Ambion) selon les recommandations du fournisseur. Les transcrits sont ensuite purifiés sur colonne à l'aide du kit MEGAclear (Ambion) selon le protocole du fournisseur. Les quantités d'ARN purifiés sont vérifiées par mesure de DO à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop sur 2µl de la préparation non diluée.

La qualité et la quantité des transcrits sont vérifiées par électrophorèse en gel d'agarose 1% immédiatement après transcription et après purification. A 50ng (dans 1µl d'eau) de chaque ARN à vérifier sont ajoutés 5µl de bleu de charge (tampon TBE avec 80% formamide). Le mélange est chauffé à 80°C pendant 5 minutes afin de dénaturer les ARN, puis est déposé dans un gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium. La migration est effectuée à 80V pendant environ 20 minutes, les ARN sont visualisés sous UV. Les ARN sont ensuite aliquotés et conservés à -80°C. A chaque nouvelle expérimentation nécessitant des ARN, les ARN utilisés sont posés à nouveau sur gel pour contrôler leur intégrité. Dans le cas de figure où les quantités sur gel ne sont pas équivalentes entre les différentes préparations d'ARN, les quantités d'ARN sont alors réajustées après quantification via le logiciel ImageQuant (GE Healthcare).

### III/ Culture de cellules

Des cellules de hamster exprimant la polymérase T7, BSR-T7 (Buchholz et al., 1999), sont transfectées avec des ADN ou ARN. Ces cellules sont cultivées en milieu DMEM additionné de 10% sérum de veau fœtal (DMEM 10%SVF) et d'antibiotiques (à 6µg/ml pénicilline et 10µg/ml streptomycine final). Des cellules de rein de singe rhésus MA104 (*macaca mulatta*) sont utilisées pour des transfections d'ARN ou infections. Ces cellules sont cultivées en milieu EMEM additionné de 10% sérum de veau fœtal (EMEM 10%) et d'antibiotiques (à 6µg/ml pénicilline et 10µg/ml streptomycine final). Enfin, la lignée cellulaire stable « C20bis » (don de P. Vende), qui exprime constitutivement la protéine NSP3 de souche RF, a été créée en transduisant des cellules MA104 avec un vecteur lentiviral (plenti 6.3, Viral power Invitrogen) qui exprime le gène 7 du rotavirus de souche RF. Des clones ont été sélectionnés par leur résistance à l'antibiotique G418, puis caractérisés pour l'expression de NSP3 par immunofluorescence. Un clone positif a été cloné à nouveau par dilution limite et sa capacité à stimuler la traduction d'un ARN rapporteur de type rotavirus a été établie.



## A/ Transfection

### 1/ Lipofection d'ADN ou d'ARN :

La veille des transfections, les cellules (BSR-T7 ou MA104) sont trypsinées, puis dénombrées à l'aide d'une cellule de Malassez, et environ 100 000cell/cm<sup>2</sup> sont mises en culture. Le lendemain, les cellules sont rincées et laissées en milieu sans sérum (ss) ni antibiotiques (DMEMss pour les BSR-T7, EMEMss pour les MA104). Les mélanges de transfection sont préparés de la façon suivante (volume modulable selon la quantité d'ADN ou ARN transfectée) : pour 1µg d'ADN/ARN contenu dans 15µl d'eau, 35µl de milieu sans sérum sont ajoutés. La lipofectamine 2000 (Invitrogen) est préparée à raison de 2,5µl (par µg d'ADN/ARN à transfecter) de lipofectamine dans 47,5µl de milieu sans sérum. Ce mélange est laissé 5 minutes à température ambiante. ARN et lipofectant sont alors mélangés et incubés à température ambiante pendant 30min. Les différents mélanges de transfection sont ensuite ajoutés aux cellules, puis incubés à 37°.

Dans le cas des gammes d'expressions de NSP3 sauvage (wt), afin de maintenir une quantité totale équivalente d'ADN entre chaque point de transfection, différentes quantités du plasmide d'intérêt (codant la protéine NSP3) ont été transfectées par lipofection avec des quantités variables (qsp 2µg) d'un plasmide contenant la séquence de NSP3 avec un codon STOP (pDeltaNSP3) prématuré au début de la phase ouverte de lecture.

### 2/ Electroporation d'ARN

Les cellules à électroporer (lipofectées ou non avec le plasmide d'expression ou infectées par le rotavirus) sont trypsinées et comptées à l'aide d'une cellule de Malassez. Pendant les différentes étapes, les cellules trypsinées sont conservées dans la glace et centrifugées à 4°C. Le nombre de cellules à électroporer est prélevé et centrifugé à 1100g pendant 5 minutes. Les cellules sont rincées dans du PBS 1X, puis sont reprises dans du tampon « R » fournis par le kit (Neon Transfection system (Invitrogen)), mélangées avec l'ADN ou l'ARN et électroporées. L'électroporation s'effectue avec l'appareil Neon Transfection system (Invitrogen), le système utilise des pointes plastiques où le piston sert à la fois d'électrode et à prélever le mélange cellules/ARN. Trois paramètres sont modulables comprenant le voltage (V), la durée d'application en milliseconde de ce voltage (ms), et le nombre de fois qu'il est appliqué (pulse). Ces conditions optimales ont été déterminées pour les cellules BSR-T7 (1400V, 20ms, 2 pulses) ainsi que pour les cellules MA104 et C20bis (1150V, 30ms, 2 pulses) et nous permettent d'utiliser quatre fois une même pointe avant d'observer une baisse d'efficacité de transfection. Après électroporation, les cellules sont incubées à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> pendant le temps requis dans du milieu supplémenté avec 10% de SVF.

Pour les ARN T2A, les mélanges d'ARN destinés à être électroporés sont constitués de 25ng d'ARN rapporteur « T2A » et de 2µg standard EMCV Rluc dans le cas de transfection en cellules BSR-T7 ; de 60ng d'ARN rapporteur « T2A » et de 2µg d'ARN standard ECMV Rluc (volume final : 10µl pour une électroporation). Les cellules transfectées sont mises dans du milieu 10% SVF, et réparties en plusieurs p24 pour une récupération à différents temps.

Pour la transfection d'ARN en cellules MA104 ou cellules C20bis,  $3.10^6$  cellules MA104 infectées ou non pendant 2h30 par les rotavirus de souche RF ou RRV à une MOI de 20, ou  $3.10^6$  cellules C20bis sont électroporées par 300ng d'ARN rapporteurs, puis resuspendues dans 1ml de milieu EMEM 10% SVF : deux aliquots de 450µl de cellules sont utilisés pour des extractions d'ARN et quantification par RT-qPCR, l'un juste après électroporation (T0), l'autre 6h post-transfection (T6). Les 100µl de cellules restantes sont récupérées 6h post-transfection pour les mesures d'activités luciférases.

### 3/ Infection par le rotavirus :

Des cellules MA104 sont trypsinées et étalées à 100 000cell/cm<sup>2</sup>. Les cellules sont rincées et laissées dans du milieu sans sérum ni antibiotiques sur la nuit avant l'infection. Le virus est ajouté aux cellules (2ml d'EMEM dans un p6 soit 10cm<sup>2</sup>) dans du milieu EMEMss supplémenté en trypsine (concentration finale à 0,5µg/ml) pour une MOI finale de 20. L'infection est conduite à 37°C pendant 2h30. Pour les cellules non-infectées (mock), l'inoculum viral est substitué par le même volume du milieu EMEMss supplémenté en trypsine.

## IV/ Transcription inverse et PCR quantitative

### A/ Récupération et stockage des cellules

Pour les mesures des quantités d'ARN par RT-qPCR, les cellules récupérées juste après transfection (T0) sont centrifugées à 1200g pendant 5 minutes dans leur milieu. Les cellules sont rincées dans 500µl de PBS 1X froid (4°C) supplémenté en RNase A (20µg/ml final) afin de dégrader les ARN qui ne seraient pas entrés dans la cellule. Dans le cas des cellules récupérées 6h post-transfection (T6), les cellules sont récupérées par grattage directement dans le PBS 1X froid supplémenté en RNase A. Les cellules sont rincées par 500µl de PBS 1X froid à 1200g pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et les culots de cellules sont ensuite stockés à -80°C en vue des extractions d'ARN. Ce même protocole est appliqué lors de l'étude faite en cellules MA104/C20bis.

### **B/ Extractions et concentrations des ARN totaux**

Les ARN totaux ont été extraits des culots cellulaires conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  à l'aide du kit Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel) suivant les instructions du fournisseur. Les ARN sont ensuite précipités afin de les concentrer. Pour un volume d'ARN donné, un tiers de volume d'acétate d'ammonium 7,5M est ajouté, ainsi que 1 $\mu\text{l}$  d'acrylamide à 5mg/ml (Ambion) comme entraîneur. A ce volume ARN/acétate sont ajoutés 3 volumes d'éthanol 100% et les ARN sont mis à précipiter à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 24h. Les mélanges sont centrifugés à 16 000g pendant 25 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant est retiré, les culots sont lavés à l'éthanol 70%. Après une nouvelle centrifugation, les culots sont séchés et repris dans 15/20 $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  RNase free. Les préparations d'ARN sont quantifiées par mesure au nanodrop, puis stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **C/ Transcription inverse aléatoire (RT) à partir des ARN totaux :**

Les ARN totaux extraits sont soumis à une transcription inverse pour pouvoir effectuer ensuite les PCR. Deux mélanges sont préparés : le mélange A est composé de 100ng d'ARN total à 10 $\mu\text{M}$  d'amorces hexamériques aléatoires (pdN6) pour un volume final de 12 $\mu\text{l}$ . Le mélange A est chauffé à  $70^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes puis refroidi dans la glace. Le mélange B est composé de 4 $\mu\text{l}$  de tampon 5X de la transcriptase inverse M-MLV (Invitrogen), de 2 $\mu\text{l}$  d'une solution de DTT à 0,1M, de 1 $\mu\text{l}$  de dNTP à 10mM (Invitrogen) et de 20UI de RNasin (Promega). Il est ajouté au mélange A et l'ensemble est incubé 10 minutes à température ambiante puis est préchauffé à  $42^{\circ}\text{C}$  pendant 2 minutes, avant l'ajout de 200U de transcriptase inverse M-MLV (Invitrogen). La transcription inverse s'effectue par incubation à  $42^{\circ}\text{C}$  pendant 50 minutes et est suivie d'une étape d'inactivation à  $70^{\circ}\text{C}$  pendant 15 minutes. Les échantillons sont dilués au 1/5 $^{\circ}$  et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **D/ PCR quantitative :**

Les PCR quantitatives ont été effectuées à partir de 5  $\mu\text{l}$  d'ADNc dans un mélange réactionnel comprenant les amorces (200nM final, Tableau 11) et 12.5  $\mu\text{l}$  d'un mélange contenant des fluorophore SYBR Green I et Rox, de la polymérase ADN Meteor Taq, des dNTPs et du  $\text{MgCl}_2$  à 4mM final (MESA green qPCR Master Mix Plus 2X) dans un volume final de 25  $\mu\text{l}$ . Chaque réaction est réalisée en triplicat. L'ensemble est incubé dans un appareil de type MxPro 3000 piloté par le logiciel MxPro-Mx3000P (Stratagene), utilisant le programme comportant 5 min à  $95^{\circ}\text{C}$  (dénaturation des matrices et l'activation de l'enzyme), puis 40 cycles de 30 sec à  $95^{\circ}\text{C}$ , 60s à  $60^{\circ}\text{C}$  et 60 sec à  $72^{\circ}\text{C}$ . Le 40e cycle est suivi d'un cycle final d'1min à  $95^{\circ}\text{C}$ , 30s à  $60^{\circ}\text{C}$  et 30s à  $95^{\circ}\text{C}$  permettant d'obtenir les courbes de dissociation des produits de PCR.

L'efficacité de chaque couple d'amorce est déterminée par la méthode classique des droites standards à partir d'un échantillon dilué en cascade (en triplicat) et est contrôlée en fin de PCR grâce à une courbe de dissociation. L'efficacité d'amplification des gènes étudiés étant de 100% (non présenté), aucun ajustement n'a été effectué lors de l'analyse des résultats.

**Tableau 11 : Oligonucléotides utilisés en PCR quantitative.**

Nom	Oligos (Sens)	Description
<b>Rluc</b>	GGAATTATAATGCTTATCTACGTGC (Forward) CAGTATTAGGAACTTCTTGGC (Reverse)	Amorces permettant l'amplification de la luciférase Renilla
<b>Fluc</b>	GGGCTCACTGAGACTACATC (Forward) CCTCTTTGATTAAACGCCAG (Reverse)	Amorces permettant l'amplification de la luciférase Firefly
<b>GAPDH</b>	CAGCCTCAAGATCATCAGCA (Forward) TGTGGTCATGAGTCTTCCA (Reverse)	Amorces permettant l'amplification de la GAPDH

En fin de réaction, l'expression des gènes est calculée selon la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001) et les valeurs obtenues sont normalisées par rapport à celles obtenues avec l'expression de la GAPDH considéré comme normalisateur et par rapport à un calibrateur. Ce calibrateur, qui est le même pour chaque amplification effectuée, permet de comparer des qPCR effectuées à des moments différents ; l'échantillon calibrateur étant le même, on considère que les cycles seuils (Cycle threshold ou Ct) des RT-qPCR de cet échantillon doivent être identiques d'une mesure à l'autre. Les Ct de chaque échantillon sont donc réajustés en conséquence par le logiciel afin que les Ct du calibrateur soit les mêmes dans chaque expérience. Les résultats représentent ainsi les quantités relatives d'ARN par rapport à ce calibrateur. La significativité des différences de niveaux d'expression de chaque gène est testée par un test de student avec une valeur p inférieure à 5 ou 1%.

## **V/ Immunodétection (Western blot (WB))**

Les cellules (pour un p24 : 250 000 cellules) à analyser par WB sont récupérées dans 500ul de PBS 1X froid puis centrifugées à 1200g pendant 5 minutes à 4°C et resuspendues dans 40ul de tampon Laemmli (10mM Tris Hcl pH 6,8 ; 10% glycerol ; 2% SDS ; 150mM  $\beta$ mercaptoethanol). Les protéines du lysat cellulaire sont séparées par électrophorèse en gel d'acrylamide 12% (SDS-PAGE 12%, système d'électrophorèse mini Protean, Biorad). Avant électrophorèse, les protéines sont dénaturées et réduites par chauffage pendant 5 minutes à 95°C en présence de  $\beta$ mercaptoéthanol (150mM) et de SDS (1,5%). La migration s'effectue dans un tampon Tris Glycine 1X, 0,1% SDS à 200V.

Les protéines séparées par électrophorèse sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF par électrophorèse transverse dans un tampon CAPS 10mM pH11, éthanol 10%. Le transfert

s'effectue à 50V pendant 1h. Les membranes transférées sont ensuite directement mises à saturer ou séchées. Les membranes sèches sont lavées dans de l'éthanol pur puis dans du tampon CAPS 10mM pH11 avant saturation. L'étape de saturation s'effectue dans du tampon TBS-Tween (20mM Tris pH7,4 ; 13,7mM de NaCl, 0,1% de Tween) avec 5% de lait écrémé pendant 1h sous agitation. Les membranes sont incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du TBS-tween à la dilution indiquée dans le tableau 12, et laissées incuber le temps nécessaire (de 1h à une nuit à température ambiante ou 4°C). Après incubation avec l'anticorps primaire, trois lavages de 10 minutes sont effectués avec le tampon TBS, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase ou à un fluorophore est ajouté à la dilution indiquée dans le tableau 12, dans du TBS 1X tween supplémenté par 5% de lait écrémé. Les membranes sont laissées 1 heure avec l'anticorps secondaire (à l'abri de la lumière dans le cas d'un anticorps couplé à un fluorophore). De nouveau, trois lavages avec tampon TBS sont effectués.

**Tableau 12 : Anticorps utilisés en immunodétection.**

<b>Cible de l'anticorps</b>	<b>Nature</b>	<b>Espèce</b>	<b>Origine</b>	<b>Dilution</b>
<b>NSP3</b>	Polyclonal	lapin	VMS	1/1000
<b>NSP5</b>	Mab	souris	VMS	1/20 000
<b>GAPDH</b>	Mab	souris	Abcam	1/40 000
<b>Anti-souris couplé peroxidase</b>	Monoclonal	Chèvre	Sigma	1/10 000
<b>Anti-lapin couplé peroxidase</b>	Polyclonal	Chèvre	Sigma	1/20 000
<b>Anti-lapin couplé IR dye 800</b>	Polyclonal	Chèvre	Thermo Scientific	1/10 000
<b>Anti-souris couplé IR dye 680</b>	Polyclonal	Chèvre	Thermo Scientific	1/10 000

### 1/ Détection par chemiluminescence :

Dans le cas d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase, les membranes sont incubées avec le substrat luminescent (ECL Thermo Scientific) de la peroxydase pendant environ 1 à 2 minutes. La révélation s'effectue en chambre noire, après différents temps d'exposition de la membrane à un film autoradiographique.

### 2/ Détection par fluorescence:

Dans le cas d'un anticorps secondaire couplé à un fluorophore, les membranes peuvent être séchées et stockées à l'abri de la lumière avant lecture. La lecture s'effectue à l'aide de l'appareil Odyssey (LICOR) où le fluorophore est excité par un laser proche de l'infrarouge (IR, 685 ou 785nm), et l'émission à 700 ou 800nm du fluorophore est acquise sur une durée spécifiée par l'utilisateur (généralement 2min sur chaque longueur d'onde). L'avantage de la détection NIR (Near InfraRed) est la faible autofluorescence naturelle à cette gamme de longueur d'onde et la très grande linéarité du signal émis.

## VI/ Mesure des activités luciférases

Les activités des luciférases Firefly (provenant de *Photinus pyralis*, 61kDa, « Firefly » luciférase ou Fluc) et Renilla (provenant de *Renilla reniformis*, 36kDa, « Renilla » luciférase ou Rluc) sont mesurées à l'aide du système Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega ).

Les luciférases Firefly et Renilla catalysent une réaction chimioluminescente à partir de deux substrats différents (respectivement luciférine et coelenterazine) ce qui permet la mesure de ces deux activités luciférases à partir d'un même lysat de cellules. L'activité Fluc nécessite du magnésium et de l'ATP et peut donc être stoppée pour ensuite mesurer l'activité Rluc (système « stop and glow » de Promega). Dans le cas où un troisième rapporteur est nécessaire, nous avons utilisé la luciférase Cypridina (provenant de *Cypridina noctiluca*, 60kDa, « Cypridina » luciférase ou Cluc). L'activité de cette luciférase est dépendante d'un substrat différent (Cypridina luciferin) des deux autres décrites précédemment et peuvent être mesurées à l'aide du kit Bioluminescence Cypridina luciferase starter kit (Biolabs).

Les cellules, exprimant la ou les luciférases, sont rincées au PBS 1X, puis lysées à l'aide du Passive Lysis Buffer (PLB, Promega) 1X pendant 15 minutes minimum. Les lysats sont conservés à -20°C. Les mesures sont effectuées à l'aide d'un luminomètre Sirius (Berthold) muni de deux injecteurs automatiques. Le jour des mesures, les substrats, respectifs des différentes luciférases, sont préparés : la Fluc est mesurée en première à l'aide du Luciferase Assay Reagent II (LARII), l'ajout du réactif « stop and glo » permet simultanément l'arrêt de l'activité Fluc et l'addition du substrat de la Rluc. L'appareil mesure l'activité luciférase toutes les 0,2s sur une durée de 10 secondes puis celles-ci sont moyennées ; les mesures sont enregistrées à l'aide du logiciel (FB12 Sirius, Berthold) fournit avec l'appareil et récupérées dans un fichier Excel.

## Chapitre 3 : Résultats

### I/ Rôle de la protéine NSP3 sur la traduction d'ARN de type rotavirus.

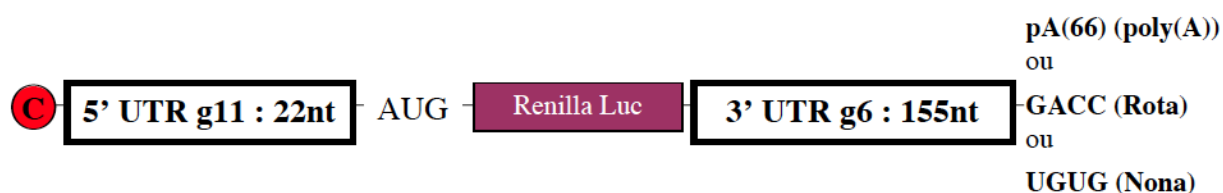
#### A/ Effet de l'infection par le rotavirus sur la stabilité des ARN de type rotavirus, non rotavirus ou polyadénylé.

##### 1/ Méthodologie

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier l'effet de l'infection par le rotavirus sur la traduction d'ARN rapporteurs de type rotavirus (3' se finissant par GACC), non rotavirus (sans GACC) ou polyadénylés. Pour cela, des cellules non infectées ou infectées ont été transfectées par ces différents rapporteurs (Figures 39 et 40).

#### **Figure 40 : Représentation des ARNm rapporteurs électroporés.**

Les ARN rapporteurs électroporés comportent la séquence codante de la luciférase Renilla encadrée des régions non codantes du gène 11 de rotavirus en 5' et du gène 6 de rotavirus en 3'. Ces ARNm sont synthétisés *in vitro* et sont coiffés en 5' et se terminent en 3' soit par la séquence GACC (Rota), UGUG (non rotavirus ou Nona), soit par une séquence de 60 adénosines (poly(A)).



Voulant étudier le rôle de la stabilisation de l'ARN sur la traduction, nous avons opté pour l'électroporation comme méthode de transfection notamment parce qu'elle nous permet de transfecter l'ARN instantanément, et en conséquence, d'étudier la stabilité et la traduction de ces ARN au cours du temps.

Dans ces expériences, nous avons choisi une méthode de standardisation par mesure des quantités d'ARN électroporés par transcription inverse et amplification quantitative en chaîne par la polymérase (RT-qPCR). La mesure des quantités d'ARN transfectés juste après électroporation (T0) par RT-qPCR nous permet de vérifier l'équivalence des quantités d'ARN transfectées, et de standardiser les activités luciférases par rapport à la quantité d'ARN introduite. La mesure relative des quantités d'ARN présents 6h après transfection (T6) nous permet d'évaluer la stabilité des ARN et de standardiser les activités luciférases par rapport aux quantités d'ARN restantes. Parallèlement, les activités luciférases issues des ARN rapporteurs sont mesurées 6h après transfection.



## 2/ Impact de l'infection par le rotavirus sur la traduction des ARNm polyadénylés

### a/ Effet de l'infection sur la stabilité des ARN rapporteurs

Nous avons tout d'abord étudié la stabilité des ARN rapporteurs dans les cellules infectées (Figure 41A, Vérification des ARN en annexe 1).

Les mesures à T0 des quantités d'ARN électroporés, indiquent que ces quantités sont équivalentes quelles que soient les conditions d'infection pour un même type d'ARN, on peut donc considérer que l'efficacité d'électroporation entre cellules infectées ou non infectées est similaire. Une quantité légèrement plus élevée d'ARN « Rota » est cependant observée comparée aux autres rapporteurs.

Pour les quantités d'ARN restantes à T6 (figure 41B), on observe :

1. Une quantité d'ARN comparable dans les cellules non infectées à T0 et T6 indiquant que les ARN électroporés sont stables dans les cellules MA104 non infectées.
2. De manière surprenante, une augmentation allant d'un facteur 2 à 3 entre T0 et T6 de la quantité des ARN rapporteurs présents dans les cellules infectées indépendamment du type de l'ARN rapporteur.

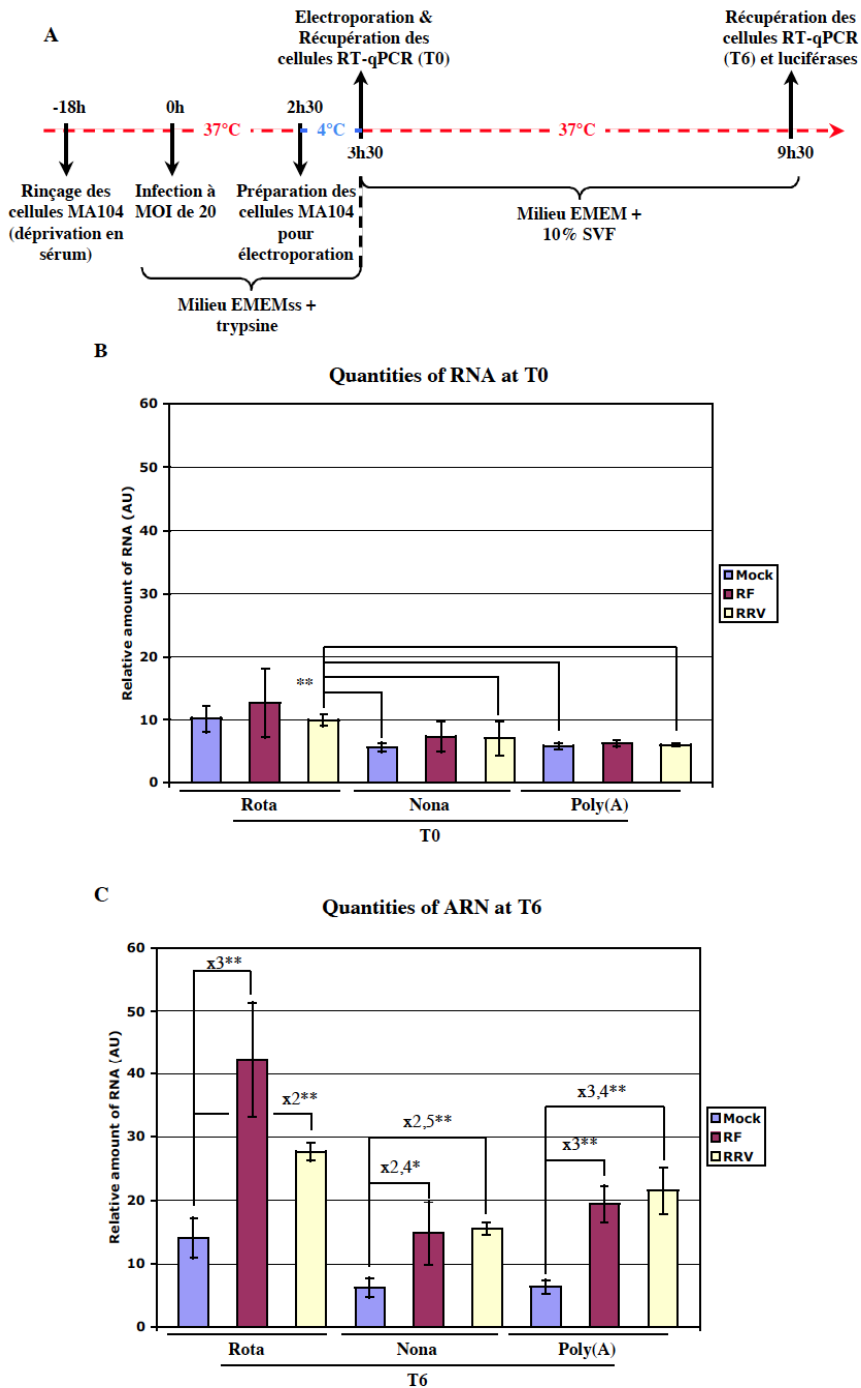
Aux vues des cycles seuils bruts (« Cycle threshold » ou Ct), c'est-à-dire avant traitement et normalisation par le calibrateur et la GAPDH (Voir Mat&Met p104), une diminution des quantités des ARN transfectés Rluc est bien observée avec une augmentation de 3 à 4 Ct entre T0 et T6 (Voir annexe 2). Cependant, la quantité des ARNm codant la GAPDH, utilisée comme normalisateur, diminue beaucoup plus puisqu'une augmentation de 5 à 6 Ct est observée. Autrement dit, la diminution des quantités d'ARN cellulaires est plus importante que celle des ARN transfectés ce qui après normalisation provoque cette augmentation de la quantité d'ARN transfectés dans les cellules infectées entre T0 et T6.

Il est raisonnable de penser que cette « augmentation » à T6 résulte d'une modification des populations d'ARN présentes dans la cellule au cours de l'infection, et que l'hypothèse de base de la RT-qPCR qui est que la quantité d'ARNm de GAPDH reste constante n'est pas respectée, ce qui invalide l'utilisation de cette méthode pour l'étude de la stabilisation des ARN dans les cellules infectées.



**Figure 41 : Effet de l'infection par les rotavirus de souches RF ou RRV sur la stabilité des ARN.**

(A)  $3.10^6$  de cellules MA104 ont été infectées ou non (Mock, en bleu) par le rotavirus de souche RF (en mauve) ou RRV (en jaune) à MOI de 20 puis ont été transfectées 2h30hpi avec 300ng d'ARN rapporteur Cap-Rluc-gacc (Rota) ou Cap-Rluc-ugug (Nona) ou Cap-Rluc-pA(60) (poly(A)). Les cellules ont été récupérées juste après électroporation (T0 en (B)) et 6h après électroporation (T6 en (C)) pour mesurer les quantités d'ARN électroporés par RT-qPCR. Les astérisques \* et \*\* correspondent respectivement à une différence significative aux valeurs  $p < 0,05$  et  $0,01$  du test de Student. Le facteur (X) indique le rapport des activités normalisées pour chacune des conditions comparées.

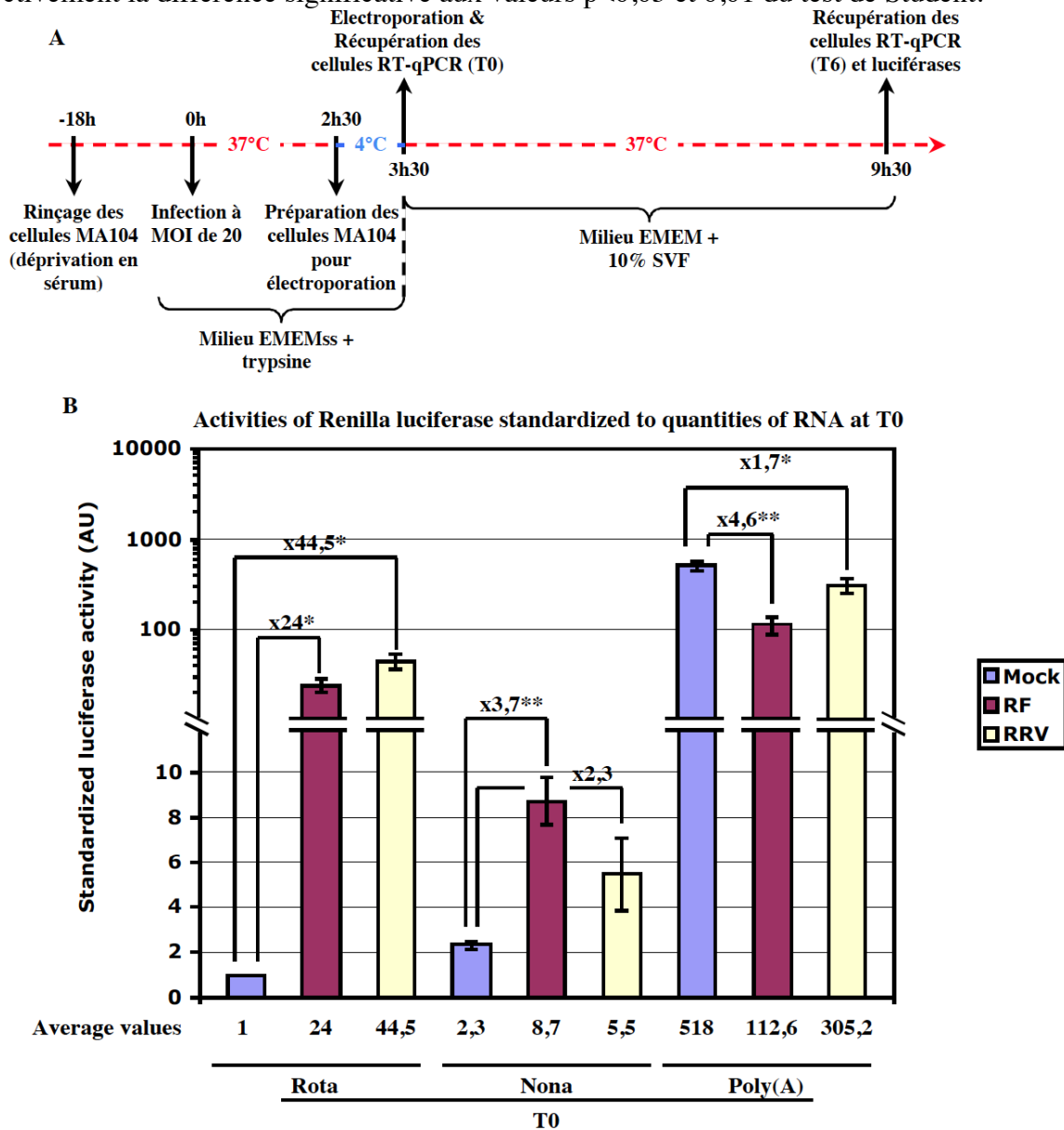


***b/ Effet de l'infection sur la traduction des ARN rapporteurs***

L'activité de la luciférase Renilla (Rluc) a été mesurée 6h après transfection et rapportée à la quantité d'ARN mesurée à T0 afin de tenir compte des légères différences d'électroporation et des quantités d'ARN électroporés entre chaque condition (Figure 42).

**Figure 42 : L'infection par le rotavirus affecte la traduction des ARNm polyadénylés.**

(A)  $3.10^6$  de cellules MA104 ont été infectées ou non (Mock, en bleu) par le rotavirus de souche RF (en mauve) ou RRV (en jaune) à MOI de 20 puis ont été transfectées 2h30hpi avec 300ng d'ARN rapporteur Cap-Rluc-gacc (Rota) ou Cap-Rluc-ugug (Nona) ou Cap-Rluc-pA(60) (poly(A)). Les cellules ont été récupérées juste après électroporation (T0) pour mesurer les quantités d'ARN électroporés par RT-qPCR et à 6h post-électroporation pour mesurer les activités luciférase. (B) Les activités luciférase ont été standardisées aux quantités d'ARN T0. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard sur trois expériences indépendantes. Le facteur (X) indique le rapport des activités rapportées pour chacune des conditions comparés. Les astérisques \* et \*\* représentent respectivement la différence significative aux valeurs  $p < 0,05$  et  $0,01$  du test de Student.



On observe (figure 42) une forte stimulation de la traduction des ARN Rota dans les cellules infectées (RF : x24 ; RRV : x44) et une diminution de la traduction de l'ARN rapporteur poly(A) d'un facteur 5 en cellules infectées par le rotavirus de souche RF, alors qu'une diminution d'un facteur 1,7 seulement est observée lors d'une infection par le rotavirus de souche RRV. On note une stimulation de la traduction des ARN Nona par l'infection (RF : x3,7 ; RRV : x2,3) ce qui peut suggérer que l'infection par le rotavirus dérégule globalement la traduction des ARN non polyadénylés.

On observe donc une différence marquée sur la traduction d'ARN poly(A) entre deux rotavirus de souches différentes : alors que le virus RF inhibe clairement la traduction de ces ARN, le virus RRV ne semble pas le faire ou pas aussi fortement. A l'inverse, la stimulation de la traduction des ARN Rota est plus forte avec le virus simien qu'avec le virus bovin.

### 3/ Application à une lignée de MA104 exprimant NSP3

Afin de déterminer si les phénomènes observés dans les cellules infectées pouvaient être reproduits avec des cellules exprimant uniquement la protéine NSP3, nous avons utilisé une lignée stable C20bis (Voir Mat et Met p101) (Figure 43, Vérification des ARN en annexe 1). Cette lignée exprime des quantités de NSP3 inférieures à celles obtenues 2 heures après une infection à une MOI de 10 avec le virus de souche RF (P.Vende, communication personnelle, voir annexe 3).

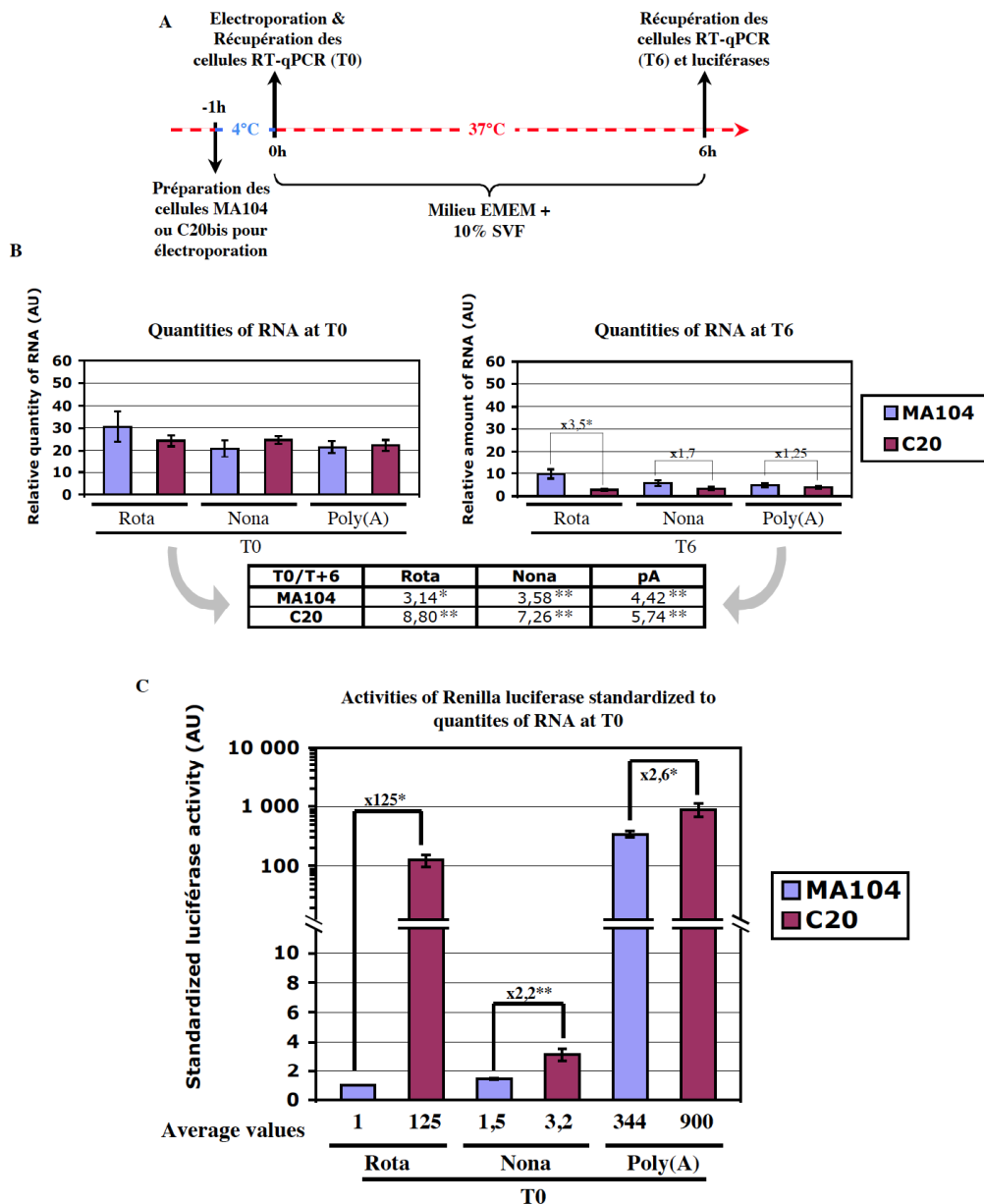
#### a/ Effet de l'expression de NSP3 sur la stabilité des ARN rapporteurs

Nous avons tout d'abord étudié les quantités d'ARN présents aux temps T0 et T6 post-électroporation dans cette lignée (C20bis) et la lignée de cellules MA104 d'origine, afin de vérifier si une stabilisation des rapporteurs transfectés est observable dans ce système (Figure 43A). Tout d'abord, on note que les mêmes quantités d'ARN sont mesurées juste après électroporation dans ces deux lignées et quel que soit l'ARN ; les deux lignées sont donc transfectables de manière équivalente. Contrairement à ce qui a été observé en cellules infectées, on note pour les deux lignées, une baisse de 3 à 9 fois entre T0 et T6 des différents ARN rapporteurs quelles que soient leurs extrémités 3'. Ce résultat est plus logique que celui obtenu avec les cellules infectées où les quantités d'ARN transfectés augmentaient au cours du temps (Figure 41).

On note que la dégradation des ARN non-poly(A) (Rota et Nona) est plus importante dans les cellules C20bis que dans les cellules MA104 entre T0 et T6 (9 fois et 7 fois moins d'ARN Rota et Nona 6 heures après électroporation des cellules C20bis contre 3 fois moins en cellules MA104 (tableau en figure 43A)). Par contre, la diminution de la quantité d'ARN poly(A) est équivalente dans les deux types de cellules (respectivement x5,74 et x4,42).

**Figure 43 : Absence d'inhibition de la traduction des ARN polyadénylés par NSP3 seule.**

(A)  $3.10^6$  de cellules MA104 ou de la lignée de C20 (MA104 exprimant constitutivement la protéine NSP3 wt de souche RF) ont été transfectées avec un mélange de 300ng d'ARN rapporteur Cap-Rluc-gacc (Rota, en bleu) ou Cap-Rluc-ugug (Nona, en mauve) ou Cap-Rluc-pA(60) (poly(A) en jaune). Les cellules ont été récupérées juste après électroporation (T0) pour mesurer les quantités d'ARN électroporés par RT-qPCR et à 6h post-électroporation (T6) pour mesurer les activités luciférase et les quantités d'ARN transfectés restants. (B) Les quantités d'ARN mesurées par RT-qPCR aux deux temps de récupération sont présentées. Les rapports des quantités d'ARN entre T0 et T6 sont présentés dans le tableau avec les astérisques \* et \*\* correspondant à une différence significative respectivement aux valeurs  $p < 0,05$  et  $0,01$  du test de Student. (C) Les activités luciférase ont été rapportées aux quantités d'ARN à 0h post-électroporation. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard sur trois expériences indépendantes. Le facteur (X) indique le rapport des activités normalisées pour chacune des conditions comparées. Les astérisques \* et \*\* indiquent respectivement la différence significative à la valeur  $p < 0,05$  et  $0,01$  du test de Student.



### b/ Effet de l'expression de NSP3 sur la traduction des ARN rapporteurs

Comme l'illustre la figure 43C, on note une stimulation globale de la traduction d'au moins un facteur 2 de tous les ARN introduits dans la lignée C20bis, par rapport aux cellules MA104. Plus précisément, s'il n'y a pas de diminution de la traduction des ARN poly(A) par l'expression de NSP3, on observe bien une stimulation (125 fois) de la traduction des ARN Rota. L'augmentation de la traduction des ARN Nona dans les C20bis est à rapprocher de l'augmentation de la traduction de ces mêmes ARN dans les cellules infectées par le rotavirus (Figure 42).

L'augmentation de l'expression des ARN Rota est sans commune mesure avec l'augmentation générale de la traduction que l'on peut attribuer à l'expression de NSP3 dans ces cellules (x125 contre x2,2-2,6). D'autre part, cette augmentation n'est pas associée à une stabilisation notable des ARN Rota dans les C20bis. L'expression de NSP3 seule reproduit donc bien l'effet stimulateur de l'infection sur la traduction des ARN Rota observé précédemment. Par contre, l'inhibition de la traduction des ARN poly(A) observée au cours de l'infection (en particulier avec la souche RF dont est issue la protéine NSP3 utilisée ici) n'est pas reproduite dans ce système.

### B/ Effet de chaque domaine de NSP3 sur la traduction d'un ARN rapporteur de type rotavirus.

#### 1/ Mise au point du système

Afin de pouvoir étudier l'importance de chaque domaine de NSP3, de la souche d'origine de NSP3 ou encore des régions non codantes des ARN rapporteurs sur la traduction, il était nécessaire de développer un système *in vivo* permettant l'expression de protéine NSP3, sauvage ou mutée, puis l'introduction d'ARN rapporteurs Rota ou non Rota.

#### a/ Expression de NSP3

L'expression de la protéine NSP3, via une transcription nucléaire dépendante de la polymérase II, avec des vecteurs de type pcDNA n'ayant pas donné satisfaction, nous nous sommes orientés vers l'expression de protéines via la transcription cytoplasmique dépendante de la polymérase T7. Dans ce système d'expression, des cellules de rein de Hamster exprimant constitutivement la polymérase T7 (BSR-T7) (Buchholz et al., 1999) sont transfectées par un plasmide d'expression. Ce plasmide contient l'ORF de la protéine d'intérêt clonée en aval du promoteur de la polymérase T7 et en amont de son terminateur. Les ARN produits par la polymérase T7 n'étant pas coiffés, l'ORF est précédée de la séquence de l'IRES du virus EMCV.

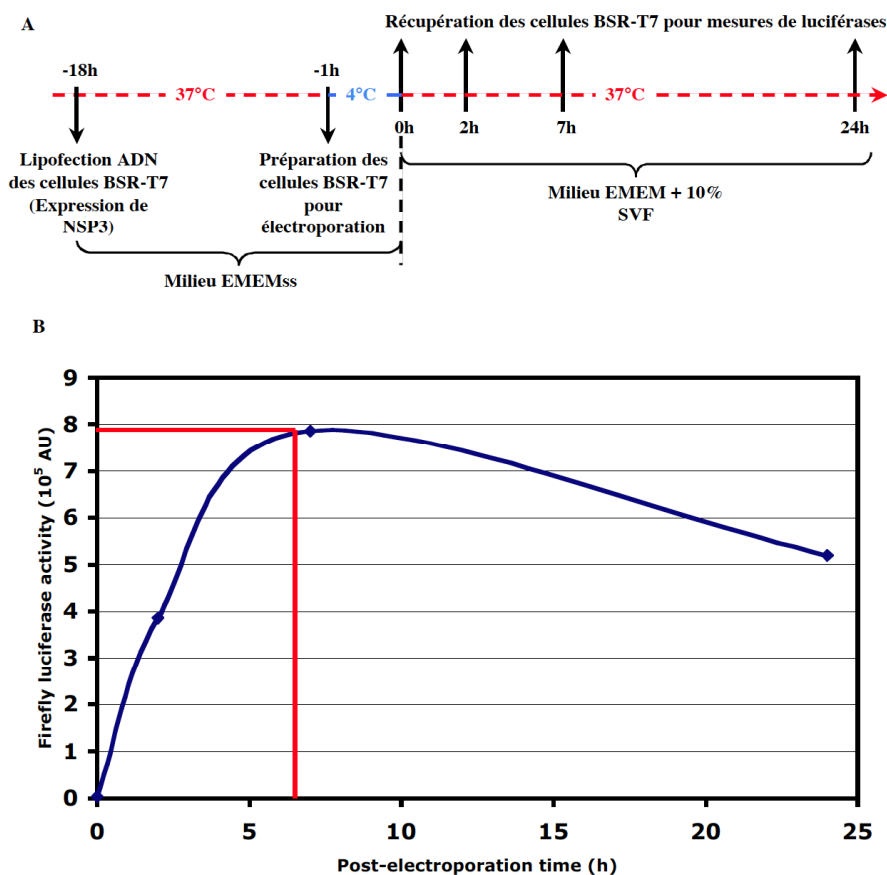
Lorsque les cellules BSR-T7 sont transfectées (par lipofection) par un vecteur de ce type contenant l'ORF de la eGFP, l'expression de la protéine eGFP est détectable 4h après transfection et persiste au-delà de 48h. Pour nos expériences, nous avons transfecté les plasmides codant la protéine NSP3 sauvage ou mutée de souche RF, puis 18h plus tard, les cellules ont été électroporées avec les ARN rapporteurs Rota.

#### b/ Cinétique d'expression de la luciférase.

Afin de déterminer à quel moment, après électroporation des ARN, l'activité luciférase est maximale, l'ARN Cap-Rluc-gacc a été électroporé dans des cellules préalablement transfectées par le vecteur d'expression T7-EMCV-NSP3wt. Les cellules ont été ensuite récupérées à différents temps après électroporation et les activités luciférase Renilla ont été mesurées (figure 44). Comme illustrée par la figure 44, l'activité luciférase est maximale aux alentours de 6/7h post-transfection. Nous avons donc fixé le temps de récupération des cellules à 6h30 post-électroporation.

**Figure 44 : Détermination du temps optimal de mesure des activités luciférase après transfection d'ARN par électroporation.**

(A) Le plasmide codant NSP3 sauvage a été transfecté dans les cellules BSR-T7. 18h plus tard, 100ng d'ARN rapporteur Cap-Rluc-gacc ont été transfectés par électroporation et les activités luciférase en (B) ont été mesurées à différents temps post-électroporation (0, 2, 7, 24h). Cet essai a été produit qu'une seule fois.



### c/ Standardisation des transfections

Un autre objectif a été de choisir un système permettant de standardiser les transfections d'ARN. L'utilisation de la standardisation par RT-qPCR utilisée précédemment n'était pas envisageable pour des raisons de commodité et de coûts des expériences. De plus, les expériences effectuées en cellules C20bis montrent que l'expression de NSP3 ne stabilise pas particulièrement les ARN Rota. Le système de standardisation le plus généralement employé utilise un autre rapporteur dit « standard » qui est transfecté en même temps que l'ARN ou l'ADN d'intérêt mais dont l'expression ne dépend pas du système étudié. Dans notre cas, il fallait identifier un ARN dont la traduction ne soit pas affectée par l'expression de NSP3 et soit indépendante de la PABP.

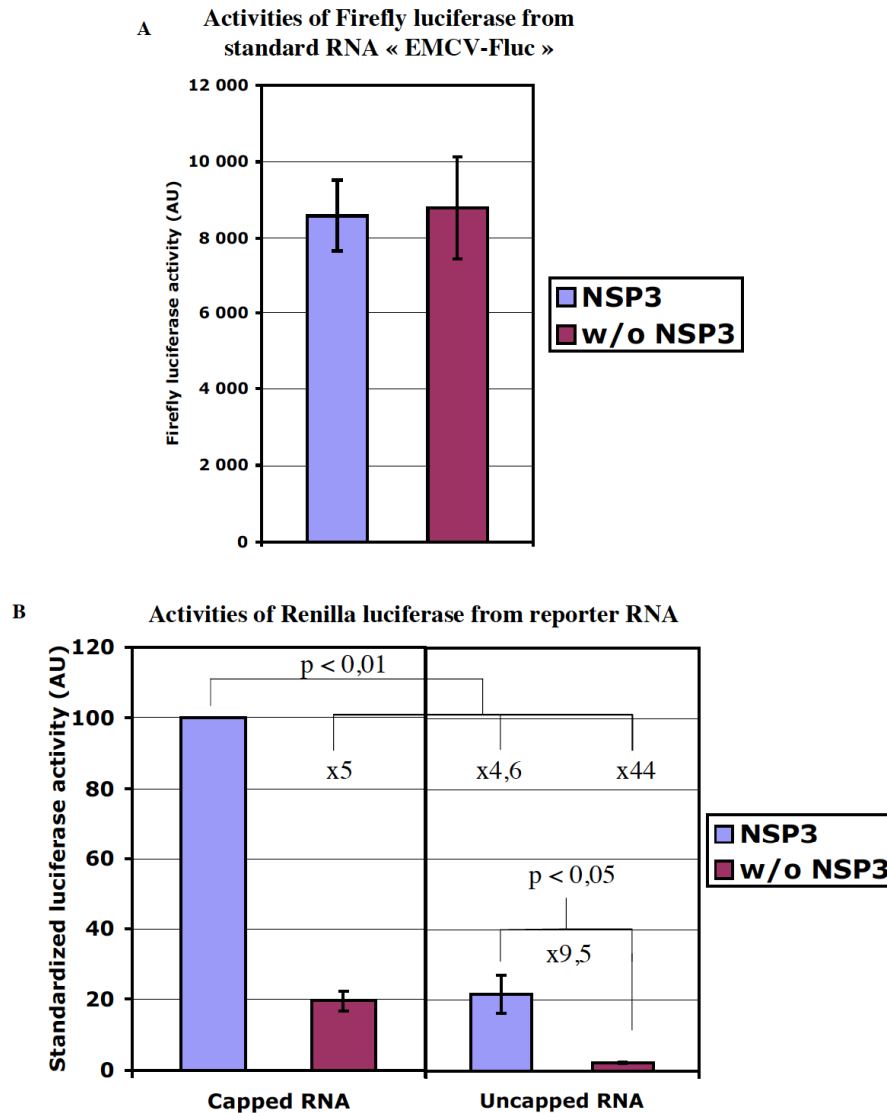
Pour cela, différents Internal Ribosome Entry Site (IRES) viraux ont été testés : celui issu du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV), celui du virus de l'hépatite C (HCV) ou celui du virus de la paralysie du criquet (CrpV). Les facteurs de traduction nécessaires diffèrent pour chacun d'entre eux : l'IRES d'EMCV nécessite tous les facteurs d'initiation, sauf le facteur liant la coiffe eIF4E, et est peu dépendant de la présence d'une queue poly(A) ou de la PABP (Svitkin et al., 2007). De plus, il interagit directement avec la partie centrale d'eIF4G permettant le recrutement de tous les facteurs d'initiation de la traduction sauf eIF4E (Kolupaeva et al., 1996). L'IRES de l'HCV ne requiert pas le complexe eIF4F pour promouvoir le recrutement de PIC (Fraser and Doudna, 2007). Enfin, l'IRES du CrpV est un cas plus extrême et recrute les ribosomes sans l'aide d'aucun autre facteur (Kamoshita et al., 2009).

Différents ARN dits « standards » du gène codant la luciférase Firefly sous contrôle de ces différents IRES ont été testés : dans le cas des IRES CrpV, et HCV les activités observées ont été tellement faibles qu'ils ont été écartés. Un rapporteur standard composé de l'IRES de l'EMCV présente les activités les plus fortes. Nous nous sommes donc concentrés sur ce candidat. La seconde étape du choix du standard était de vérifier que celui-ci ne serait pas affecté par la surexpression de NSP3.

Pour cela, des cellules BSR-T7 ont été transfectées par les vecteurs pT7 EMCV-NSP3wt ou pT7 EMCV-NSP3stop (portant un codon de terminaison en position 6 de NSP3 ; contrôle négatif), puis les cellules ont été transfectées par un mélange d'ARN rapporteurs Rluc coiffés ou non coiffés se finissant par GACC et d'ARN standards EMCV-Fluc. Dans un premier temps, nous avons regardé l'effet de l'expression de NSP3 sur la traduction de l'ARN standard (Figure 45A).

**Figure 45 : Effet de l'expression de la protéine NSP3 sur la traduction d'un ARN EMCV-Fluc et effet de l'absence de coiffe sur la traduction dépendante de NSP3.**

2µg de plasmides codant (en bleu) ou non (en mauve) la protéine NSP3 ont été transfectés dans les cellules BSR-T7, puis ont été électroporées 18-24h plus tard avec un mélange de 50ng d'ARN rapporteur (cap-Rluc-gacc ou -Rluc-gacc) et 1µg d'ARN standard EMCV-Fluc. Les activités luciférase Firefly (A) et Renilla ont été mesurées 6h30 post-transfection. Les activités Renilla ont été rapportées à celles du standard de transfection (B). Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards de trois expériences indépendantes. Un facteur (x) indique la différence entre chacune des conditions comparées, la valeur p au test de Student est indiquée lorsqu'il y a une différence significative.



Comme présenté en figure 45A, aucune différence d'activités luciférase Firefly n'est observable entre cellules exprimant ou n'exprimant pas NSP3. L'expression de NSP3 n'a donc pas d'influence sur la traduction d'un ARN standard sous contrôle d'un IRES d'EMCV : cette méthode de standardisation a donc été utilisée par la suite.



#### d/ Effet de la présence d'une coiffe sur les ARN rapporteurs et standardisation des transfections

Les ARN rapporteurs sont synthétisés *in vitro* à l'aide d'un kit (mMessage mMachine T7 ULTRA) contenant un analogue non inversible de la coiffe (Stepinski et al., 2001). Les proportions d'ARN synthétisés coiffés ou non coiffés sont difficiles à estimer. Aussi, nous avons voulu vérifier quelle part pouvait avoir la traduction des ARN non coiffés dans les activités luciférase mesurées. L'activité de la luciférase Renilla issue d'ARN rapporteurs Renilla de type rotavirus coiffés (Cap-Rluc-gacc) ou non coiffés (-Rluc-gacc) ont été mesurées 6h30 post-électroporation et rapportées à celle issue de l'ARN standard (figure 45B).

La stimulation de la traduction des ARN de rotavirus par NSP3 est retrouvée : la présence de NSP3 stimule d'environ 5 fois la traduction de l'ARN Cap-Rluc-gacc. Un facteur 10 de stimulation en présence de NSP3 est observé dans le cas où les ARN rapporteurs ne sont pas coiffés. Cependant, dans le cas de -Rluc-gacc, l'activité luciférase mesurée est quasiment nulle en absence de NSP3, ce niveau de stimulation n'est donc élevé que parce que le niveau de base est extrêmement bas.

Dans tous les cas, le niveau d'activité issu des ARN non coiffés dans ce système d'étude est faible, donc la présence de ces ARN dans nos préparations d'ARN n'est pas un problème pour l'étude de la traduction dépendante de NSP3. On note aussi un effet synergique (>2) entre les extrémités 5' et 3' puisque la stimulation de la traduction d'un ARN coiffé par NSP3 est supérieure à la somme de l'activité de l'ARN en absence de NSP3 ou en absence de coiffe.

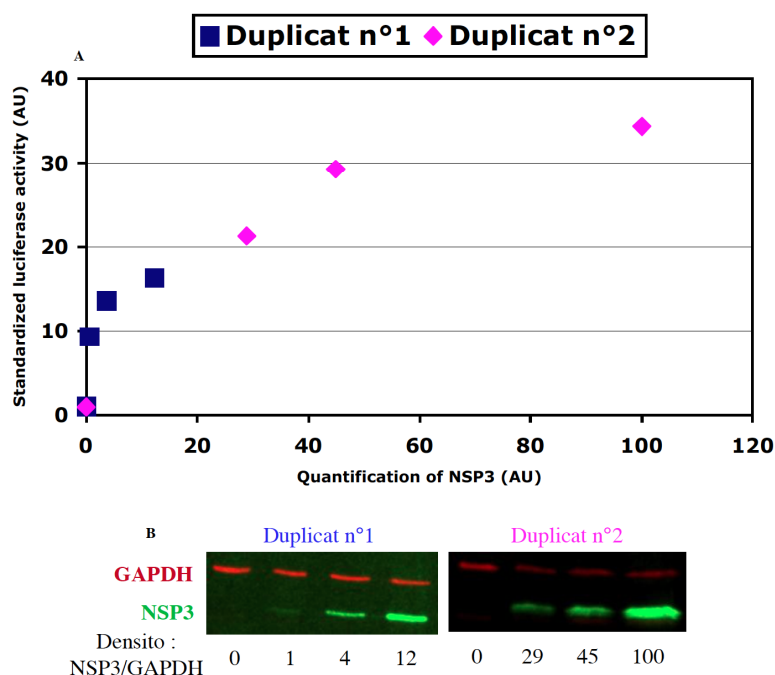
#### e/ Effet d'une quantité variable de NSP3 sur la traduction d'un ARN rapporteur

Existe-t-il un seuil d'expression de NSP3 au-delà duquel la traduction des ARN de rotavirus n'est plus augmentée ? Nous avons utilisé le système que nous avons développé afin d'évaluer l'expression du rapporteur Cap-Rluc-gacc en fonction de la quantité de NSP3 exprimée dans les cellules. Des BSR-T7 ont été transfectées avec différentes quantités de plasmides codant NSP3 afin d'obtenir une gamme d'expression de NSP3. Ces cellules ont ensuite été électroporées avec l'ARN rapporteurs Cap-Rluc-gacc et l'ARN standard EMCV-Fluc. Pour chaque condition, les activités luciférase ont été mesurées et l'expression de NSP3 a été vérifiée par Western Blot, la quantité de NSP3 étant normalisée par la quantité de GAPDH détectée sur la même membrane de transfert. Deux essais ont été effectués avec 2 / 0,7 / 0,3 / 0µg de plasmides codant NSP3 wt, la quantité totale d'ADN étant maintenue constante par addition d'un plasmide codant NSP3 avec un codon STOP prématuré (dNSP3). Deux essais de gamme ont été effectués, cependant les expressions de NSP3 wt observées dans chacun d'entre eux ont été très différentes, de telle sorte que les deux essais

rassemblés permettent d'obtenir une gamme d'expression de NSP3 plus étendue. La figure 46A montre les résultats obtenus avec le rapport des activités Rluc/Fluc en fonction de l'expressions de NSP3 rapportées à l'expression de la GAPDH.

**Figure 46 : Effet d'une quantité variable de NSP3 sur la traduction d'un ARN rapporteur.**

(A) Différentes quantités (0 ; 0,3 ; 0,7 ; 2 $\mu$ g) du plasmide pT7-EMCV-NSP3 codant la protéine NSP3 sauvage (wt) ont été transfectées par lipofection dans des BSR-T7 : la quantité totale d'ADN transfectés étant maintenue constante par addition du plasmide pT7-EMCV-NSP3stop. 18h plus tard, 50ng d'ARN rapporteurs Cap-Rluc-GACC et 1 $\mu$ g d'ARN standard EMCV-Fluc ont été cotransfectés par électroporation (en triplicat). Les activités luciférase ont été mesurées 6h30 après électroporation. Les activités luciférase issues du rapporteur (Rluc) sont rapportées à celles du standard (Fluc), la représentation graphique correspond au regroupement de deux expériences indépendantes où chaque duplicat est représenté sous une couleur différente. (B) Les quantités des protéines surexprimées sont vérifiées et quantifiées par immunodétection. Les valeurs de densitométrie correspondent au rapport des quantités de NSP3 à celles de la GAPDH des deux expériences.



Comme illustrée par la figure 46, même une faible expression de NSP3 est suffisante pour induire une bonne traduction du rapporteur Cap-Rluc-gacc avec un facteur 9 de stimulation entre la traduction obtenue en l'absence de NSP3 et le premier point d'expression de NSP3. Lors de ces essais, une plus forte stimulation de la traduction a pu être observée puisqu'un facteur 35 a été obtenu entre la condition sans NSP3 et le point de la gamme le plus élevé. Cette disparité par rapport aux essais présentés plus haut s'explique probablement par le fait que les cellules BSR-T7 utilisées ici étaient issues d'un nouveau lot ayant subi moins de passage en culture. On peut noter

que si l'activité luciférase augmente avec la quantité de NSP3, elle ne semble pas atteindre de plateau même avec la quantité maximale de NSP3 exprimée.

## 2/ Application du système : étude de l'effet des domaines de NSP3

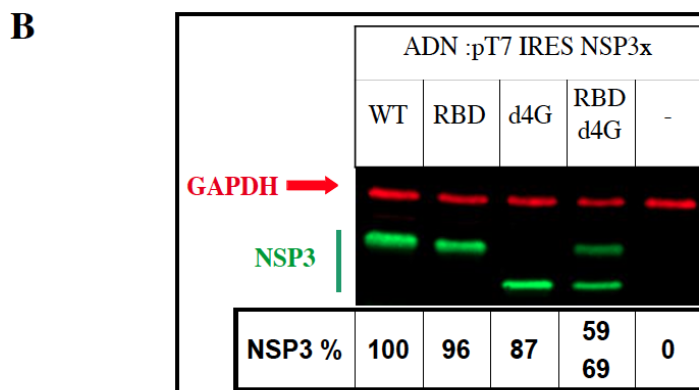
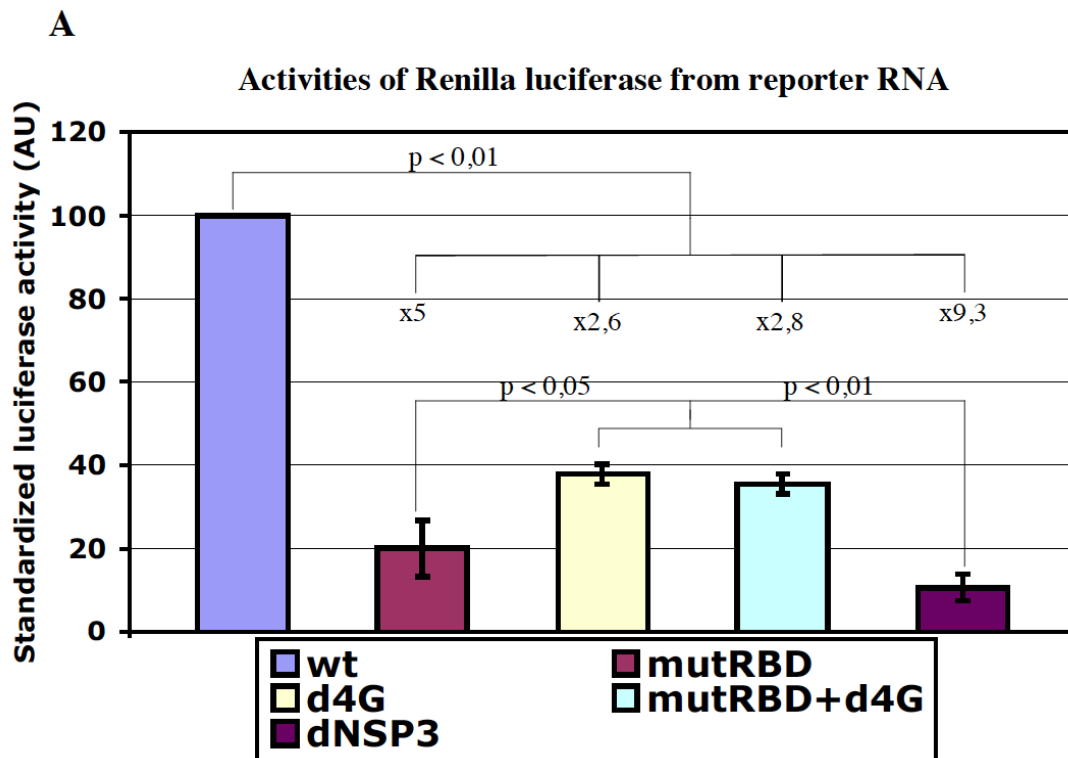
La même méthodologie a été appliquée avec des cellules BSR-T7 exprimant les protéines NSP3 sauvage (wt) ou mutées dans le domaine de liaison à l'ARN (mutRBD) ou dans le domaine de liaison à eIF4G (d4G) ou avec des cellules BSR-T7 transfectées avec un plasmide témoin (pT7-EMCV-NSP3stop) ne codant pas de NSP3. La cotransfection des plasmides codant NSP3 mutRBD et NSP3 d4G a été aussi effectuée afin de voir s'il pouvait y avoir une complémentation des mutations (Figure 47).

On note tout d'abord (Figure 47B) que les différentes protéines NSP3 sont exprimées à un niveau équivalent sauf dans le cas de la coexpression des mutants de liaison à l'ARN et à eIF4G. Cela s'explique par le fait que la quantité totale d'ADN transfectée est la même, il y a donc deux fois moins de plasmide de chaque construction.

Les activités luciférase Renilla issues du rapporteur de type rotavirus montrent (Figure 47A) que les différents domaines de NSP3 sont importants : la présence de NSP3wt permet d'augmenter la traduction de l'ARN rapporteur d'environ 10 fois (wt vs dNSP3). Lorsque le domaine de liaison à l'ARN est muté, l'activité Renilla est diminuée d'un facteur 5 par rapport à l'activité luciférase Renilla (Rluc) obtenue en présence de la protéine NSP3wt (wt vs mutRBD) alors que ces deux protéines sont exprimées à un niveau équivalent. Dans le cas d'une délétion du domaine de liaison à eIF4G, l'activité Rluc est réduite d'un facteur 3 par rapport à l'activité Rluc obtenue en présence de la protéine NSP3wt (wt vs d4G). On peut expliquer ceci par le fait que le mutant d4G est toujours capable de lier les ARN rapporteurs par leurs extrémités 3' GACC, permettant donc leurs stabilisations dans la cellule. Lorsque les deux mutants mutRBD et d4G de NSP3 sont coexprimés, la stimulation de la traduction du rapporteur est équivalente (facteur 3) à la stimulation observée avec la seule expression du mutant d4G. Ce résultat montre que pour qu'il y ait une stimulation efficace de la traduction des ARNm de rotavirus, les deux domaines de liaison à l'ARN et à eIF4G d'un dimère de NSP3 doivent être fonctionnels.

**Figure 47 : Les deux domaines de NSP3 sont nécessaires pour stimuler la traduction des ARNm de rotavirus (traduction en trans).**

**(A)** 2µg de plasmides codant les protéines NSP3 sauvage (wt, en bleu), mutées dans le domaine de liaison à l'ARN (mutRBD, en mauve), dans le domaine de liaison à eIF4G (d4G, en jaune) ont été transfectés par lipofection dans des BSR-T7. La coexpression de mutRBD et d4G a aussi été effectuée (mutRBD+d4G, en cyan). 18-24h plus tard, 50ng d'ARN rapporteurs Cap-Rluc-GACC et 1µg d'ARN standard EMCV-Fluc ont été cotransfectés par électroporation (en triplicat). Les activités luciférases ont été mesurées 6h30 post-électroporation. Les activités Rluc du rapporteur sont rapportées à celles du standard (Fluc), les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards dans 4 expériences indépendantes faites en triplicat. Un facteur indique la différence chiffrée entre chacune des conditions comparées, la valeur p du test de Student est indiquée lorsqu'il y a une différence significative. **(B)** L'expression des différentes protéines NSP3 a été vérifiée par immunobuvardage pour chaque répétition. La moyenne des quantifications par densitométrie est présentée sur l'exemple présenté.



### C/ Mesure de l'effet « cis » de NSP3 sur la traduction d'un ARN rapporteur de type rotavirus.

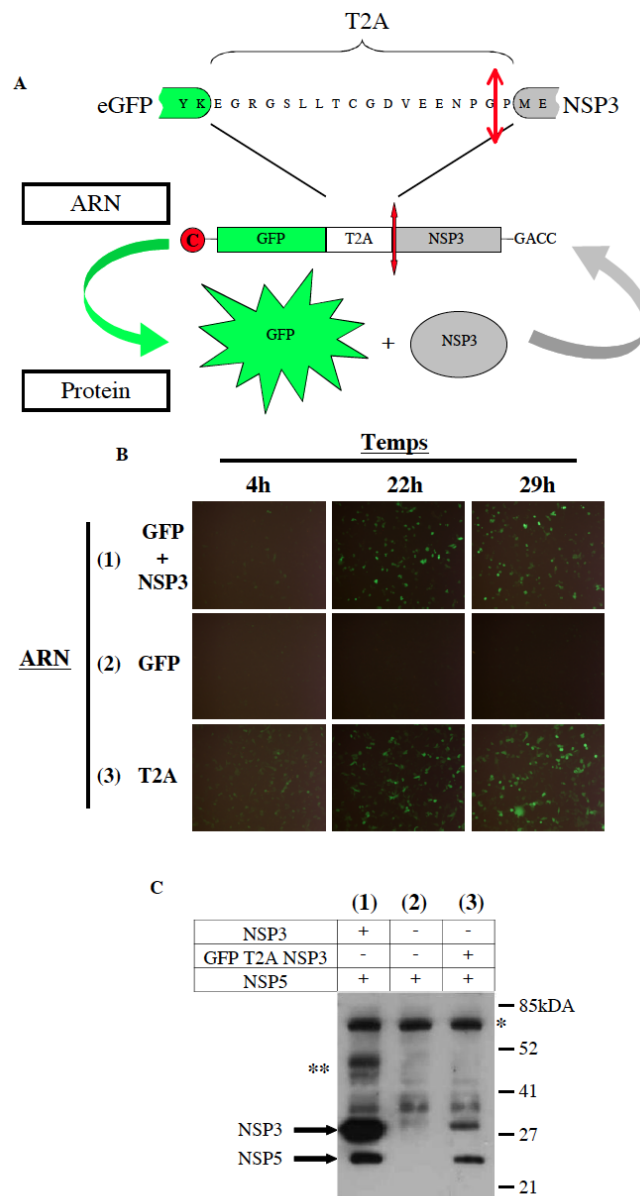
Le système présenté dans la partie précédente nous a permis d'étudier l'effet de NSP3 lors de la traduction d'un rapporteur en trans et nous a permis de montrer l'importance des domaines de liaison à l'ARN et à eIF4G de NSP3. Cependant, cette méthode ne reproduit pas une véritable infection puisque l'ARN rapporteur de type rotavirus est introduit dans des cellules qui expriment déjà NSP3. Lors de l'infection par le rotavirus, NSP3 n'est pas présente dans la particule infectieuse et doit donc être synthétisée une fois le virus dans la cellule. Il est alors normal de se demander si NSP3 est nécessaire à sa propre synthèse. Autrement dit, comment les premières molécules de NSP3 sont-elles synthétisées ? Y a-t-il juste une « fuite » du système de contrôle d'expression qui permet la traduction (certes peu efficace) d'ARN non-polyadénylés ou existe-t-il un mécanisme actif comme par exemple des séquences propres à l'ARNm codant NSP3, qui lui permettrait d'être traduit en absence de celle-ci ? Pour aborder cette question, deux approches méthodologiques ont été utilisées.

#### 1/ Cotransfection d'ARN

Cette approche a consisté à transfecter un ARN rapporteur Rota exprimant l'eGFP (Cap-eGFP-gacc) ou l'ARNm 11 du rotavirus (Cap-NSP5-gacc ; transcrit *in vitro* à partir du plasmide priboz-RF11-BSA) et codant la protéine NSP5 (Cap-NSP5-gacc), seules ou en combinaison avec l'ARNm 7 du rotavirus (Cap-NSP3-gacc ; transcrit *in vitro* à partir du plasmide priboz-RF07-BSA) permettant l'expression de NSP3 (Cap-NSP3-gacc). L'expression de l'eGFP étant visualisée par microscopie à fluorescence et celle de NSP3 et NSP5 par immunodétection (Western blot). Dans ce cas, la lipofection a été utilisée comme méthode de transfection car, étant plus efficace que l'électroporation, elle permet la caractérisation de l'expression des protéines par fluorescence (eGFP) ou immunodétection (NSP3&NSP5). La figure 48 illustre le résultat obtenu. L'expression des protéines eGFP et de NSP5 est dépendante de l'expression de NSP3 : en effet, lorsque l'ARN Cap-NSP3-gacc est transfecté avec l'ARN Cap-eGFP-gacc, l'expression de l'eGFP est observable dès 4h post-transfection (Figure 48A ligne 1) ce qui n'est pas le cas de l'ARN Cap-eGFP-gacc seul (Figure 48A ligne 2). Ce résultat montre que l'eGFP n'est exprimée à un niveau détectable à partir d'un ARN non polyadénylé que si NSP3 est présente. De même, l'expression de NSP5 n'est détectée par immunodétection que lors de la cotransfection de l'ARN Cap-NSP3-gacc et Cap-NSP5-gacc (Figure 48B puit 1 et 2). Il faut noter que dans ce cas, les deux ARN utilisés correspondent exactement (5' et 3' UTR, ORF) aux ARNm viraux des gènes 7 et 11 du rotavirus de souche RF.

**Figure 48 : Principe des ARNm « T2A ».**

(A) Schéma d'un ARNm « T2A » : lors de la traduction de cet ARN, le peptide T2A se clive permettant la séparation des protéines eGFP ou luciférase et NSP3. La séquence « T2A » reste fusionnée à la luciférase (ou GFP) tandis que la séquence peptidique de NSP3 débute par une proline (partie Cter du « T2A »). La protéine NSP3 va reconnaître l'extrémité 3' de l'ARN « T2A » et stimuler sa traduction. (B) Des cellules BSR-T7 ont été transfectées avec différents mélanges d'ARNm synthétisés in vitro : (1) 500ng Cap-GFP-gacc avec 500ng Cap-NSP3-gacc ; (2) 500ng Cap-GFP-gacc ; (3) 500ng Cap-GFPT2ANSP3-gacc. La fluorescence de la eGFP a été observée 4, 22 et 29h après transfection. (C) Des cellules BSR-T7 ont été transfectées avec différents mélanges d'ARNm synthétisés in vitro : (1) 500ng Cap-NSP3-gacc avec 500ng Cap-NSP5-gacc ; (2) 500ng Cap-NSP5-gacc ; (3) 500ng Cap-GFPT2ANSP3-gacc avec 500ng Cap-NSP5-gacc . Les lysats cellulaires ont été déposés sur gel d'acrylamide et les protéines NSP3 et NSP5 ont été révélées par immunodétection. La bande de haut poids moléculaire (indiquée par un \*) présente dans chacun des puits correspond à un signal non spécifique. Un bande non identifiée est indiquée par les astérisques \*\*.



## 2/ Le système « T2A » : preuve du concept

Si l'expression de NSP3 peut être dans un premier temps indépendante de NSP3, un basculement vers une traduction dépendante de NSP3 est envisageable suite à la synthèse des premières molécules de NSP3. Pour étudier ce phénomène, une étude cinétique de l'expression de NSP3 est nécessaire. De plus, le système précédent ne nous permet pas de mesurer directement les quantités de NSP3 synthétisées via un gène rapporteur ni de normaliser les transfections d'ARN.

J'ai donc conçu un système dans lequel le même ARN permet à la fois l'expression de NSP3 et du gène rapporteur. Pour cela, l'ORF codant la protéine eGFP a été clonée en amont de l'ORF codant NSP3 dans le gène 7 de rotavirus de souche RF. Entre ces deux ORF, et en phase avec les deux ORF, a été placée la séquence codant un fragment de la protéine 2A du virus *Thosea asigna* (virus de lepidoptère, famille des *Tetraviridae* (Szymczak et al., 2004)). Lors de la traduction de l'ARNm, la séquence « T2A » permet le clivage de la protéine de fusion eGFP-T2A-NSP3 en une protéine eGFP-T2A et une protéine NSP3 (seule une proline est ajoutée à l'extrémité N terminal de NSP3 Figure 48C). Il faut aussi noter que l'ARN Cap-eGFP-T2A-NSP3-gacc porte les séquences 5' et 3' non codantes du gène 7 de rotavirus de souche RF. Ainsi, si ces séquences apportent des propriétés particulières (traduction indépendante de la coiffe par exemple) à l'ARNm de rotavirus, celles-ci seront retrouvées avec cet ARN rapporteur.

La présence d'un site de restriction BsaI à l'extrémité de la séquence 3' non codante du gène 7 permet la synthèse *in vitro* d'un ARNm Cap-eGFP-T2A-NSP3-gacc codant pour une protéine de fusion eGFP-T2A-NSP3 se terminant par la séquence GACC. La fonctionnalité de ce système a été vérifiée par lipofection d'ARN dans des cellules BSR-T7 (Figure 48).

Contrairement à ce qui a été observé avec l'ARN Cap-eGFP-gacc seul, la transfection de l'ARN Cap-eGFP-T2A-NSP3-gacc permet l'expression de l'eGFP (Figure 48A ligne 3). La protéine NSP3 après transfection de l'ARN Cap-eGFP-T2A-NSP3-gacc peut être détectée par immunodétection (Figure 48B puit 3) à la taille attendue (35kDa). L'absence de bande de haut poids moléculaire, correspondant à la protéine de fusion eGFP/NSP3 non clivée, montre que le clivage par la séquence T2A fonctionne efficacement (la bande de haut poids moléculaire, indiquée par « \* » dans la figure 48B, est non spécifique puisque présente dans tous les puits). Une autre bande, indiquée par les astérisques \*\*, est présente dans le puit 1, cependant nous ignorons son origine. La cotransfection de l'ARN Cap-eGFP-T2A-NSP3-gacc avec l'ARN Cap-NSP5-gacc permet l'expression de la protéine NSP5 (Figure 48B puit 3) montrant que la protéine NSP3 produite après clivage est bien fonctionnelle. Enfin, on peut observer qu'à partir de l'ARN Cap-eGFP-T2A-NSP3-gacc, la protéine NSP3 est synthétisée (Figure 48B puit 3), migre au même niveau que la protéine NSP3 synthétisée avec l'ARN Cap-NSP3-gacc (Figure 48B puit 1), bien qu'en moindre quantité.

### 3/ Application du système « T2A »

L'ensemble de ces données montre que l'approche « T2A » est fonctionnelle et permet d'étudier la traduction dépendante de NSP3 en cis. La séquence eGFP a été par la suite substituée par celle de la luciférase Firefly pour permettre une quantification. Dans ce cadre, nous avons opté pour une transfection par électroporation : les luciférases étant des rapporteurs particulièrement sensibles, nous pouvons ainsi effectuer une étude quantitative et cinétique à partir d'un lot de cellules transfectées simultanément. Pour cette étude, différentes constructions ont été créées avec des séquences de NSP3 sauvage ou mutées dans ses différents domaines (Figure 49).

De manière similaire à l'étude de la traduction dépendante de NSP3 en trans, un standard est nécessaire pour s'assurer que les transfections d'ARN seront équivalentes. Ici, l'ARN rapporteur « T2A » codant la luciférase Firefly, nous avons donc utilisé un ARN codant la luciférase Renilla sous dépendance de l'IRES EMCV luciférase comme ARN standard (EMCV-Rluc).

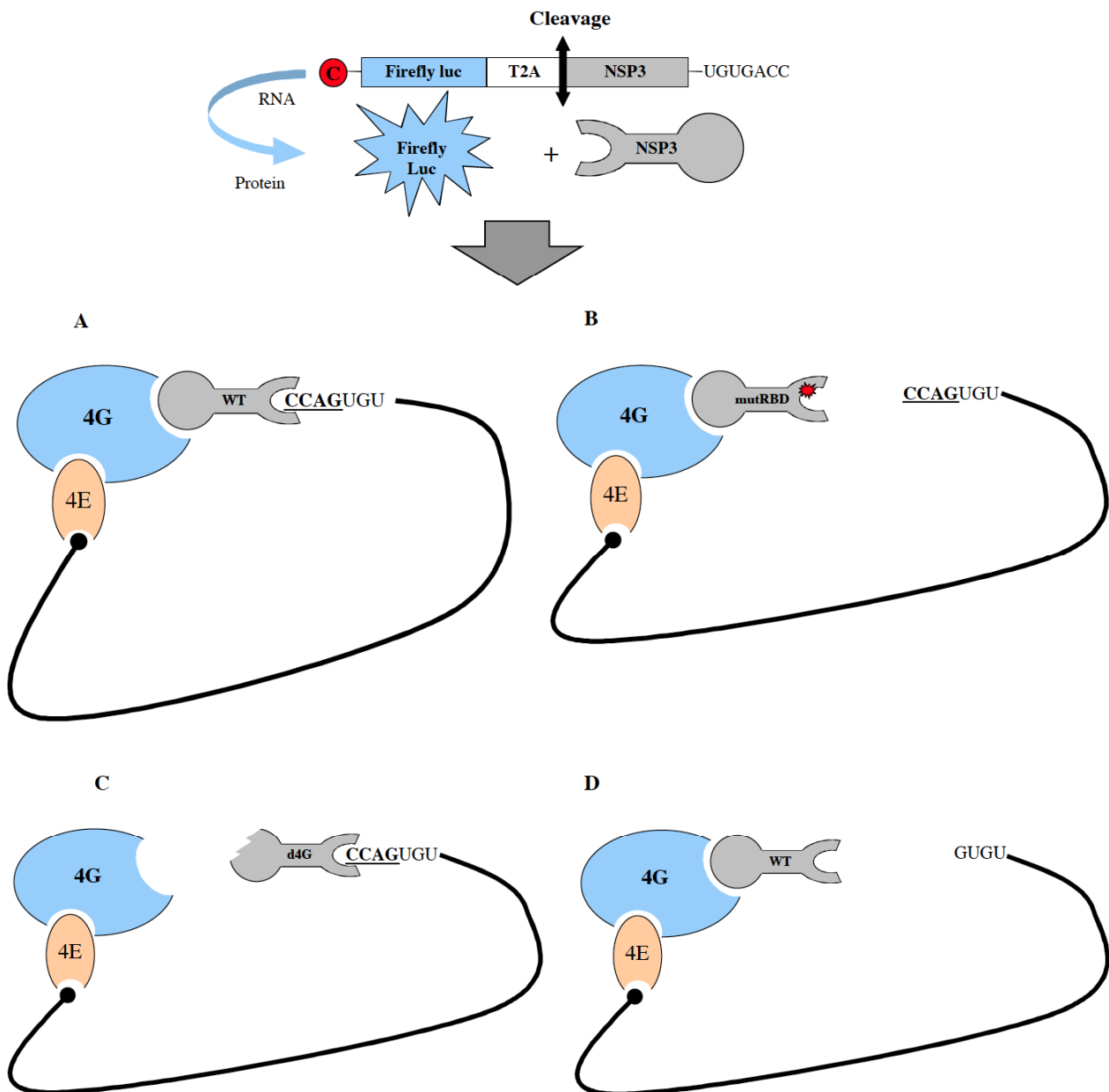
#### a/ Vérification de la dépendance à la coiffe de la traduction du gène codant NSP3

Une traduction indépendante du complexe eIF4F de l'ARN du gène 7 de rotavirus pourrait expliquer l'expression de NSP3 à partir d'un ARN non polyadénylé au cours de l'infection. J'ai donc testé avec le système « T2A » l'efficacité de la traduction des ARN non coiffés. Pour cela, des ARN « T2A », coiffés (Cap-Fluc-T2A-NSP3-gacc) ou non coiffés (-Fluc-T2A-NSP3-gacc), codant NSP3 sauvage ont été transfectés par électroporation dans des cellules BSR-T7 avec l'ARN standard EMCV-Rluc. Les activités luciférases ont été mesurées à différents temps après électroporation (Figure 50, vérification des ARN en annexe 4). Les activités Fluc et Rluc sont présentées séparément car le rapport Fluc/Rluc utilisé précédemment ne rend pas bien compte de l'évolution des activités luciférases au cours du temps.



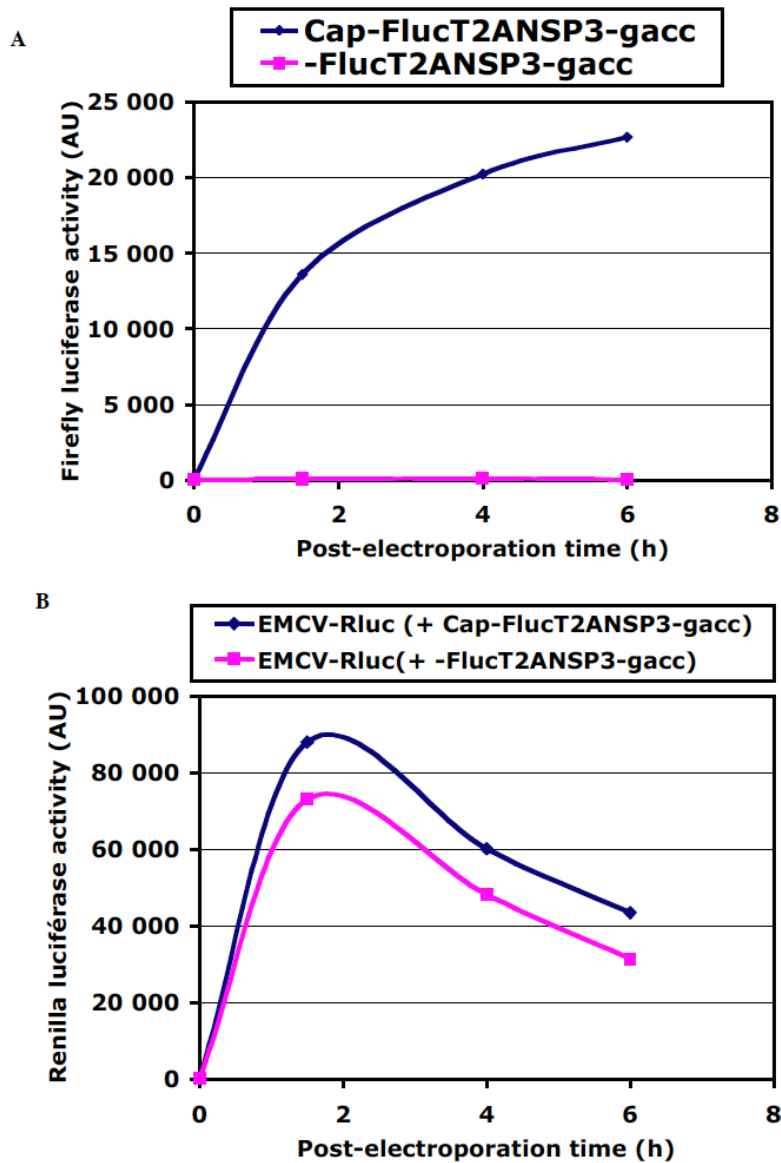
**Figure 49 : Constructions plasmidiques utilisées dans l'approche « T2A ».**

Les ARN « T2A » coiffés et se terminant par l'extrémité 3' consensus GACC de rotavirus ont été synthétisés *in vitro*. L'ARN est composé des séquences codant les protéines luciférase Firefly et NSP3, séparées par la séquence codant le peptide T2A. Les trois séquences sont en phase. En cours de synthèse, les protéines Fluc ou eGFP sont séparées de la protéine NSP3 grâce à l'activité autocatalytique du peptide T2A. Différentes protéines NSP3 ont été testées : **(A)** la protéine sauvage (wt) capable de fixer l'extrémité 3' des ARN de rotavirus, et le facteur eIF4G. **(B)** la protéine mutante de liaison à l'ARN (mutRBD) incapable de fixer l'extrémité 3' des ARN de rotavirus mais capable de fixer le facteur eIF4G. **(C)** la protéine mutante de liaison à eIF4G (d4G) capable de fixer l'extrémité 3' des ARN de rotavirus mais incapable de fixer le facteur eIF4G. **(D)** le mutant de délétion de l'extrémité 3' de l'ARN (Nona, se finissant par UGUG). Cet ARN code une protéine NSP3 sauvage mais il ne peut pas être fixé par cette dernière à cause de la délétion de la séquence GACC à l'extrémité 3'.



**Figure 50 : Effet de la coiffe sur l'activité luciférase des ARN « T2A ».**

Des cellules MA104 ont été transfectées par électroporation avec un mélange de 100ng de rapporteurs Cap-FlucT2ANSP3-gacc (en bleu) ou -FlucT2ANSP3-gacc (en rose) et 1µg d'ARN standard EMCV-Rluc. Les activités luciférase Firefly **(A)** et Renilla **(B)** ont été mesurées à différents temps post-électroporation (0h ; 1,5h ; 4h et 6h).



Une augmentation de l'activité luciférase Firefly est observable dans le cas d'un ARN rapporteur « T2A » coiffé, alors qu'aucune activité Fluc n'est mesurable avec les ARN non coiffés (figure 50A). Les activités issues de l'ARN standard étant équivalentes dans les deux cas (figure 50B), et les deux ARN provenant de la transcription de la même matrice ADN, cette différence provient donc ni d'une différence de transfection ni d'une différence de séquence. Cet essai montre

deux choses : d'une part ce système fonctionne avec une luciférase Firefly, et d'autre part, la présence des séquences 5' et 3' non codante du gène 7 ne permet pas une traduction indépendante de la coiffe.

#### *b/ Rôle de la protéine NSP3 dans la traduction de son propre ARNm*

Si les séquences non codante du gène 7 de rotavirus permettent à cet ARN d'être traduit en l'absence de NSP3, alors l'introduction des mutations mutRBD et d4G, employées précédemment (voir p121) dans l'ARN Cap-Fluc-T2A-NSP3-gacc ou l'utilisation d'un ARN ne se terminant pas par gacc ne devrait pas affecter l'activité Fluc obtenue après électroporation de cet ARN

Dans ce but, des cellules BSR-T7 ont été transfectées avec les ARN Cap-FlucT2ANSP3wt ou porteurs de mutations dans les domaines d'interaction avec l'ARN ou eIF4G de NSP3, ou à l'extrémité 3'. Les activités luciférases mesurées sont présentées en figure 51A (Vérification des ARN en annexe 4).

La traduction de l'ARN standard (EMCV-Rluc) est équivalente avec chaque ARN rapporteur prouvant qu'il n'y a pas de biais au niveau des différentes électroporations (Figure 51, panneau de droite). Un facteur 2 de stimulation est observé entre Cap-FlucT2ANSP3wt-gacc et Cap-FlucT2ANSP3mutRBD-gacc ou Cap-FlucT2ANSP3d4G-gacc (significatif à partir de 6h post-électroporation). Un facteur 4 est observé entre Cap-FlucT2ANSP3wt-gacc et Cap-FlucT2ANSP3wt-ugug codant NSP3 sauvage mais ne se terminant pas par l'extrémité GACC (significatif à partir de 1h).

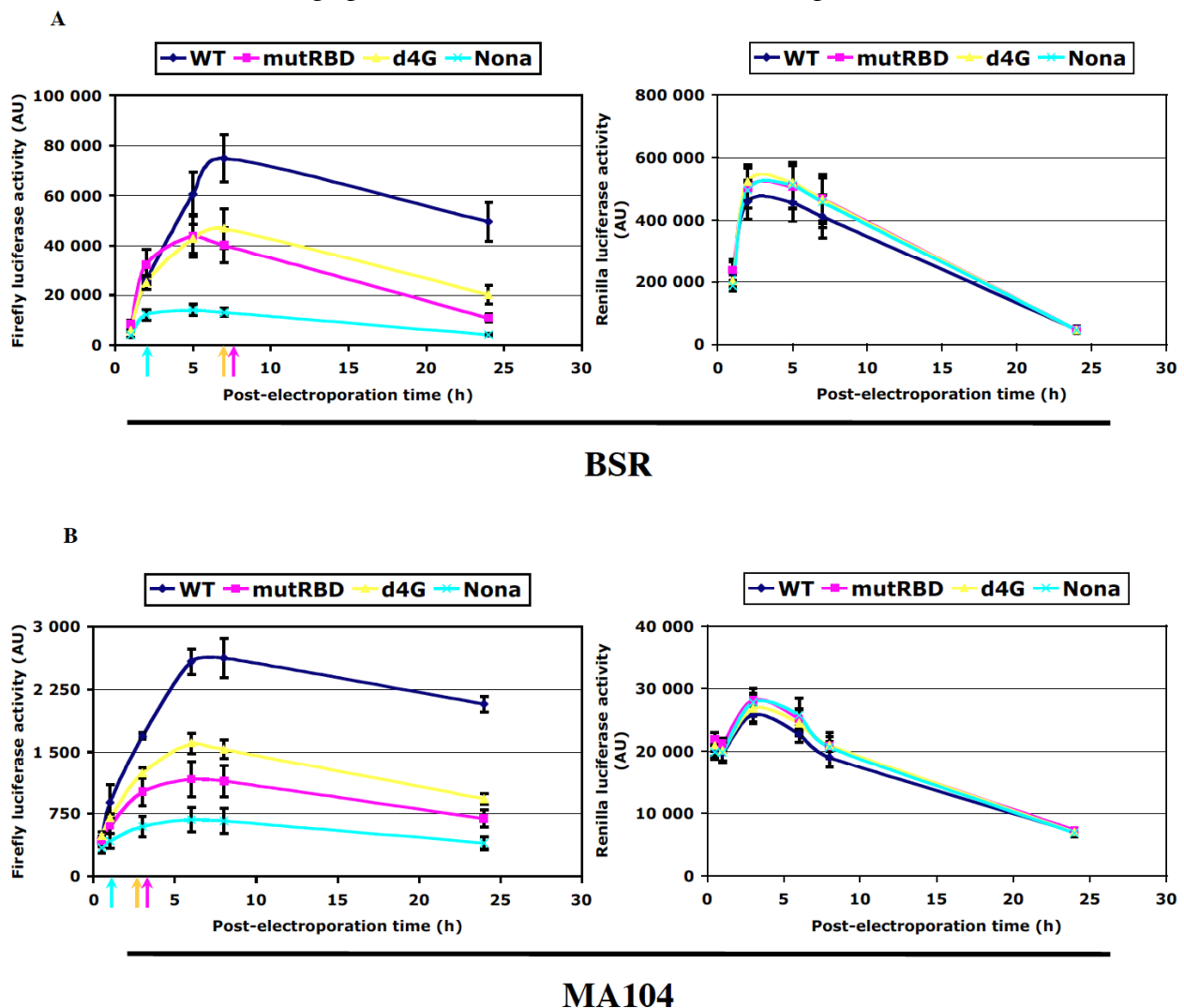
Cette même expérience a été répétée ensuite en cellules MA104 (Figure 51B). Dans ce cas aussi, les activités Renilla issues de l'ARN standard sont équivalentes dans les quatre conditions, prouvant que les efficacités d'électroporations sont identiques. L'effet de NSP3 sur la traduction de son propre ARN est similaire à celui observé avec les cellules BSR puisqu'une diminution d'un facteur 3 est observée dans l'expression Fluc quand le domaine de liaison à l'ARN est muté (wt vs mutRBD, significatif à partir de 3h) ; une diminution d'un facteur 2 est observée lorsque NSP3 est mutée dans le domaine de liaison à eIF4G (wt vs d4G, significatif à partir de 3h) ; et enfin, un facteur 4 est observé lorsque NSP3 n'est pas mutée mais que l'extrémité 3' GACC est supprimée (wt vs Nona, significatif à partir de 2h). Il n'y a pas de différence significative entre les mutants mutRBD et d4G.

Ce système nous permet de mimer les étapes précoces de l'infection par le rotavirus : de nouveau, on peut voir l'importance de la liaison de NSP3 à l'ARN et à eIF4G. Le fait que le mutant de liaison à l'ARN (mutRBD) ait le même niveau de traduction que le mutant d4G peut signifier

que l'effet de NSP3 ne se produit pas au niveau de la stabilisation des ARN puisque le mutant mutRBD n'est pas capable de protéger l'extrémité 3' de l'ARN.

**Figure 51 : Les deux domaines fonctionnels de NSP3 sont nécessaires à la stimulation la traduction de son propre ARN (traduction en cis).**

Des cellules BSR-T7 (A) ou MA104 (B) ont été transfectées par électroporation avec un mélange de 25ng (BSR) ou 60ng (MA104) d'ARN rapporteur Cap-FlucT2ANSP3-gacc codant la protéine NSP3 sauvage (WT, en bleu) ou mutée dans le domaine de liaison à l'ARN (mutRBD, en rose) ; dans le domaine de liaison à eIF4G (d4G, en jaune) ou au niveau de l'extrémité de l'ARN (Nona, en cyan). Ces différents rapporteurs ont été cotransfectés avec 1ug d'ARN standard EMCV Rluc. Les activités luciférase Firefly et Renilla ont été mesurées à différents temps post-électroporation (BSR : 1/2/5/7/24h ; MA104 : 0,5/1/3/6/8/24h). Une flèche de couleur (correspondant à la couleur des NSP3 mutantes présentées plus haut) indique à partir de quel temps une différence significative est observée avec NSP3 sauvage pour le test de student avec une valeur  $p < 0,01$ .



La différence d'activité obtenue avec un ARN rapporteur codant NSP3 mutée dans le domaine de liaison à l'ARN, et un ARN rapporteur muté au niveau de l'extrémité 3' GACC peut s'expliquer de deux manières : soit le mutant de liaison à l'ARN est encore capable de fixer

faiblement la séquence GACC, ce qui permettrait une stabilisation de l'ARN et/ou un recrutement de l'ARN par la machinerie de traduction. Soit, la présence d'une extrémité autre que l'extrémité 3' GACC a un impact sur la stabilité de l'ARN ou sur sa capacité à être traduit en l'absence de poly(A).

### *c/ Effet de NSP3 sur la stabilité des ARN de type rotavirus*

Afin de vérifier si la stimulation de la traduction induite par le seul domaine de liaison à l'ARN de NSP3 était liée à une stabilisation des ARN dans le cytoplasme, des cellules MA104 ont été transfectées par les différents ARN « T2A » et EMCV-Rluc puis les quantités d'ARN « T2A » restantes ont été mesurées par RT-qPCR. Afin de pouvoir déterminer si une stabilisation précoce des ARN par NSP3 avait lieu, les ARN ont été récupérés à des temps précoces (0, 10, 40, 70min) après électroporation. Les activités luciférase étant mesurées à 0, 1, 4 et 6h après électroporation. Les résultats des activités luciférase et des mesures des quantités d'ARN par RT-qPCR sont présentés figure 52.

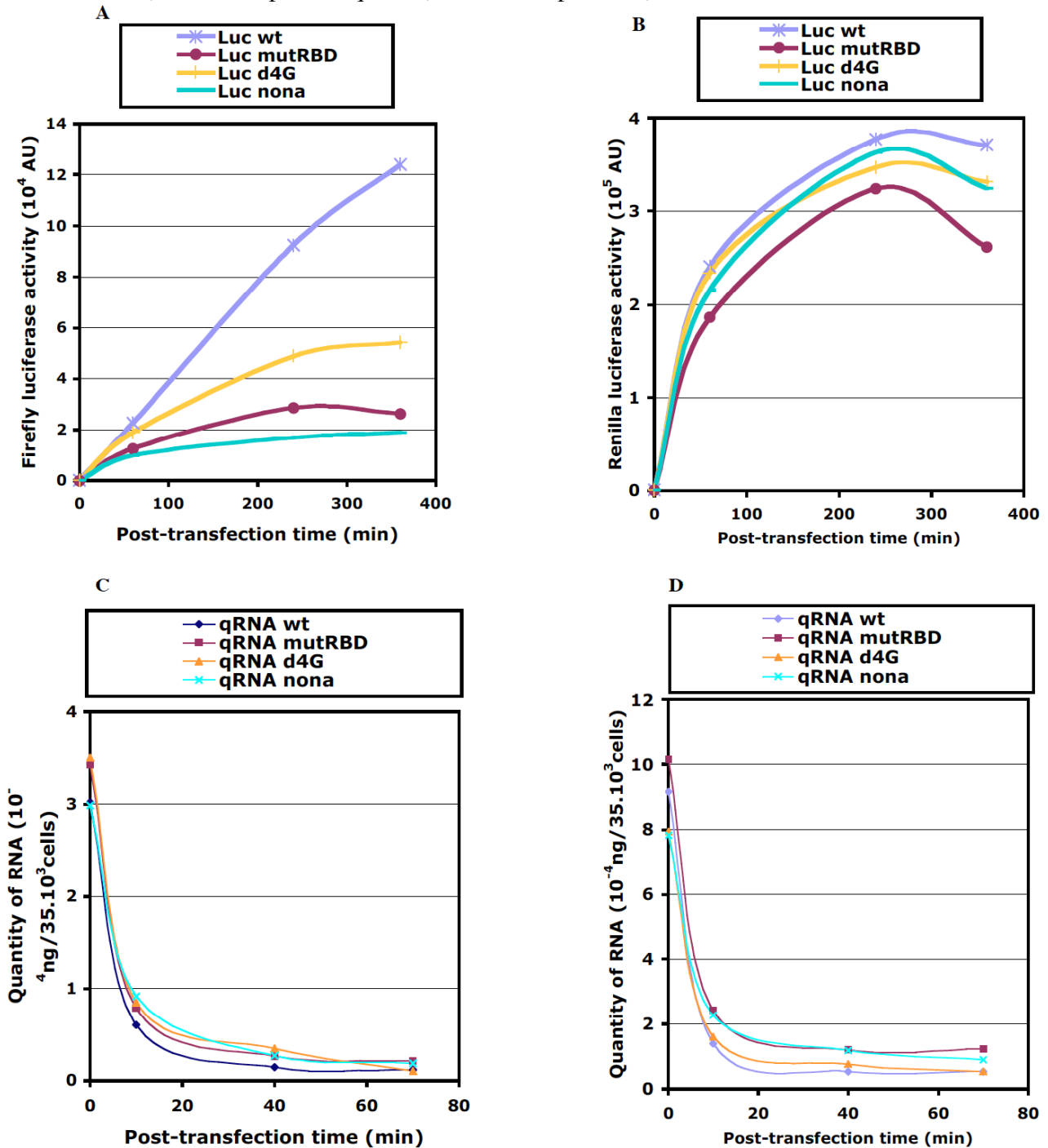
Les activités Fluc issues des rapporteurs Cap-FlucT2ANSP3-gacc sont similaires à celles présentées en figure 51 à 6h après électroporation. Un facteur 2 est observé entre Cap-FlucT2ANSP3wt-gacc et Cap-FlucT2ANSP3d4G-gacc et un facteur 4 entre Cap-FlucT2ANSP3wt-gacc et Cap-FlucT2ANSP3wt-ugug (Nona) et entre Cap-FlucT2ANSP3wt-gacc et Cap-FlucT2ANSP3mutRBD-gacc. Les activités issues de l'ARN standard sont équivalentes synonyme que les transfections ont eu la même efficacité (Figure 52B).

Les quantités d'ARN mesurées par RT-qPCR en fonction du temps présentent un profil similaire quels que soient les ARN « T2A » ou standard transfectés (Figure 52C et 52D). Outre le fait qu'aucune différence de stabilité des ARN n'est observée quelle que soit la protéine NSP3 synthétisée, on peut aussi remarquer que les ARN transfectés sont dégradés très rapidement (en 10min), alors que l'activité luciférase continue d'augmenter bien plus longtemps. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette dégradation rapide et ces différences de cinétique :

1. NSP3 n'est pas présente dès l'arrivée de l'ARN, ce dernier est alors rapidement dégradé par la cellule.
2. Seule une faible fraction des ARN, non détectée par RT-qPCR, est prise en charge et stabilisée par la protéine NSP3 pour être traduite.
3. Les quantités de protéines NSP3 wt ou d4G produites sont trop faibles pour observer une stabilisation des ARN mais suffisantes pour stimuler la traduction.

**Figure 52 : Absence de stabilisation des ARN pris en charge par NSP3.**

Des cellules MA104 ont été transfectées par électroporation avec un mélange de 100ng d'ARN rapporteurs Cap-FlucT2ANSP3-gacc codant la protéine NSP3 wt ou mutées dans le domaine de liaison à l'ARN (mutRBD) ; dans le domaine de liaison à eIF4G (d4G) ; à l'extrémité 3' avec suppression du gacc (Nona) et 800ng d'ARN standard EMCV-Rluc. Les cellules ont été récupérées à 0, 10, 40, 70min après électroporation pour mesurer les quantités d'ARN par RT-qPCR et à 0, 1, 4, 6h pour les activités luciférase. Les graphiques représentent les activités luciférase Firefly issues du rapporteur T2A (A) ou Renilla de l'ARN standard (B) ; ainsi que les quantités correspondantes des ARN rapporteurs T2A (C) ou des ARN standard (D) (contenus dans 1,6ng d'ARN totaux, soit  $35 \cdot 10^3$  cellules) mesurées par RT-qPCR (une seule expérience).



Afin de tester les hypothèses 1 et 3 ci-dessus, j'ai étudié la stabilisation des ARN rapporteurs de type rotavirus transfectés dans des cellules BSR-T7 surexprimant la protéine. Les activités luciférases et les quantités d'ARN ont été mesurées par RT-qPCR à différents temps comme précédemment, nous n'avons cependant pas pu observer de stabilisation des ARN rapporteurs en présence de NSP3 via cette autre approche (Résultats non présentés).

#### **D/ Application du système T2A aux mutants thermosensibles de NSP3**

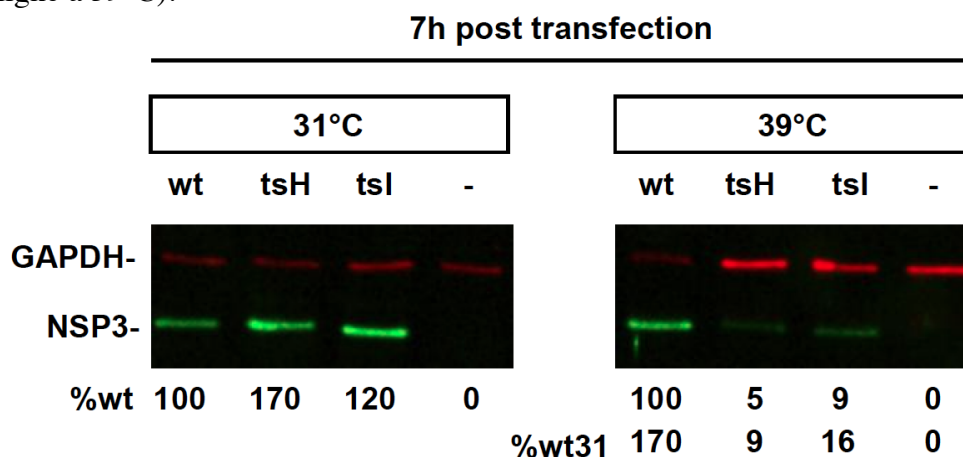
Un projet du laboratoire auquel j'ai participé a été de caractériser l'effet de mutations conférant un caractère thermosensibles (ts) à la protéine NSP3. Comme décrits précédemment, des virus mutants ts de souche SA11 ont été obtenus dans les années 1980 (Gombold et al., 1985; Gombold and Ramig, 1987; Ramig, 1982). Parmi ces mutants, deux d'entre eux (tsH et tsI) présentent une mutation de la séquence codant NSP3 avec une substitution G128/R et une substitution A95G respectivement pour les mutants tsH et tsI (Voir p91). Nous avons voulu vérifier si ces mutations conféraient bien un caractère ts à la protéine NSP3.

Pour cela, les séquences codantes de NSP3 tsH et tsI ont été insérées dans le système T2A, et les ARN synthétisés *in vitro* ont été lipofectés en cellules BSR-T7 ou MA104 à 31 et 39°C. Cependant, via ce système, je n'ai pas pu mesurer de différences d'activité entre un ARN rapporteur T2A pris en charge par NSP3 wt, d'un ARN rapporteur T2A pris en charge par NSP3 ts (Résultats non présentés).

Le seul système m'ayant permis de mettre en évidence le caractère ts des mutants de NSP3 a été l'immunodétection de NSP3 après lipofection d'ARN. Des ARN synthétisés *in vitro* codant pour NSP3 wt ou mutants ts, coiffés en 5' et se terminant par GACC en 3', ont été transfectés en cellules BSR-T7 à 31 et 39°C. Les cellules transfectées ont été récupérées à différents temps et les quantités de protéines NSP3 ont été mesurées par immunodétection (Figure 53) et les quantités des protéines ont été rapportées soit à la quantité de protéines NSP3 wt à la même température, soit à la quantité de protéines NSP3 wt à température permissive (Vérification des ARN en annexe 4).

### Figure 53 : Effet de mutations thermosensibles sur la protéine NSP3.

Des cellules BSR-T7 ont été transfectées par lipofection avec 100ng d'ARN rapporteurs Cap-NSP3-gacc codant la protéine NSP3 wt ou mutantes thermosensibles (tsH ou tsI). Les cellules ont été récupérées à 7h après lipofection. Les quantités de NSP3 ont été quantifiées par immunodétection. Les pourcentages représentent les quantités de protéines soit par rapport à la protéine NSP3 wt à chaque température (première ligne), soit par rapport à la quantité de la protéine NSP3 wt à 31°C (deuxième ligne à 39°C).



Comme présentés en figure 53 pour le temps 7h post-transfection, alors qu'à 31°C, on observe une quantité plus importante de protéines NSP3 ts par rapport à la protéine wt (de 170 et 120% pour tsH ou tsI respectivement), à 39°C, la quantité de NSP3 wt est 10 à 20 fois plus importante que celles des protéines NSP3 ts. De plus, alors que la quantité de protéines NSP3 wt synthétisées augmente entre 31 et 39°C, la quantité, de protéine NSP3 tsH et tsI, diminue. Ces résultats montrent soit que les protéines mutantes sont plus rapidement dégradées à 39°C que la protéine sauvage du fait d'un mauvais repliement, soit que les mutations tsH et tsI ont un effet sur la capacité de NSP3 à induire la traduction de son propre ARN puisque les protéines mutées ne s'accumulent pas ou très peu à 39°C. Cette dernière hypothèse est en accord avec les résultats publiés montrant l'effet thermosensible de ces mutations sur la fixation de NSP3 à l'ARN (Voir l'article en annexe).

## II/ Etude des caractéristiques des ARNm de rotavirus susceptibles d'influencer leur traduction

NSP3 étant absente de la particule virale entrante, les premiers ARNm viraux synthétisés doivent donc être traduits en absence de NSP3. La protéine cellulaire PABP ayant de nombreux rôles dans la traduction des ARN poly(A), et la traduction des ARN de rotavirus se faisant en absence de PABP sur eIF4G, on peut se demander si NSP3 et les ARN de rotavirus compensent l'absence de PABP par des propriétés ou des mécanismes de traduction particuliers. Par exemple,



on peut légitimement se demander si les séquences 5' et 3' non codante (UTR) ont une influence sur la traduction des ARNm de rotavirus. Nous nous sommes donc intéressés :

1. Aux séquences non codantes des ARNm de rotavirus, afin de savoir si elles peuvent conférer un avantage lors de leur traduction sans NSP3.
2. A des protéines NSP3 autre que la protéine de souche RF qui pourraient avoir des affinités différentes pour l'extrémité 3' consensus de rotavirus ou pour des extrémités non canoniques.

#### A/ Etude sur l'extrémité 3' des gènes de rotavirus reconnue par NSP3

La séquence de l'extrémité 3' de certains ARNm de rotavirus peut varier suivant les souches virales étudiées. Par exemple, le gène 7 codant la protéine NSP3 de la souche SA11 se termine par GGCC, celui de la souche RRV par GACC (HQ846849) ou GGCC (AY065842) suivant les auteurs. Enfin, le gène 5 codant la protéine virale NSP1, chez les souches RRV et SA11, se termine de façon variable en GAACC ou GAAACC etc... (Dunn et al., 1994; Matthijnsens et al., 2008; Okada et al., 1999).

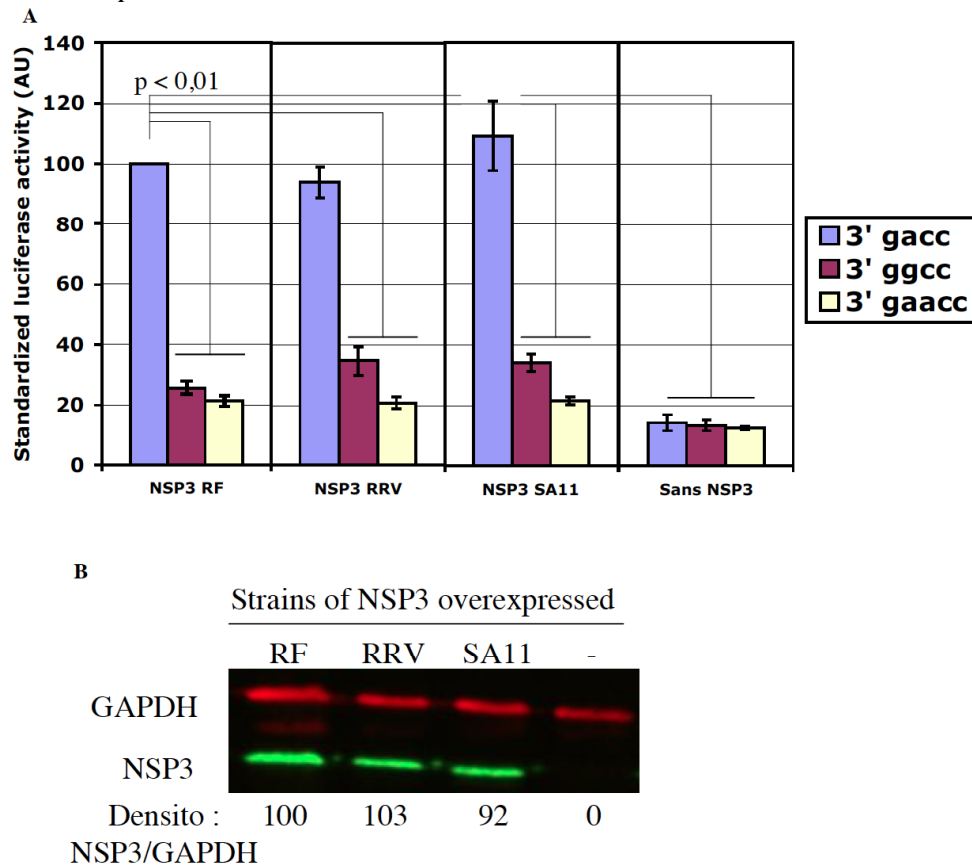
Quels sont les impacts de ces séquences sur la traduction dépendante de NSP3 et quelle est l'influence de la séquence peptidique de NSP3 sur la traduction des ARN porteurs de ces séquences non canoniques ? Il se pourrait par exemple que la protéine NSP3 de la souche SA11 soit moins spécifique et/ou moins affine pour l'extrémité 3' GACC ou ait acquis une spécificité supplémentaire pour la séquence GGCC. Nous avons donc utilisé le système d'expression en BSR-T7 et d'électroporation décrit plus haut pour tester l'efficacité de ces différentes protéines NSP3 et des extrémités GACC, GGCC et GAACC.

#### 1/ Effet des extrémités GACC, GGCC ou GAACC sur la traduction des ARN « Rota » en présence de NSP3 des souches RF, RRV ou SA11.

Dans ce but, des ARN rapporteurs Renilla se finissant par GACC, GGCC ou GAACC en 3' ont été testés pour leurs capacités à être traduit par des protéines NSP3 d'origines différentes. Pour cela, des cellules BSR-T7 ont été transfectées par lipofection par un plasmide d'expression T7-IRES codant les protéines NSP3 wt des souches RF, RRV ou SA11. Les cellules transfectées ont été ensuite électroporées par un mélange d'ARN rapporteurs Cap-Rluc-gacc, Cap-Rluc-ggcc ou Cap-Rluc-gaacc et d'ARN standard EMCV-Fluc et les activités luciférase ont été mesurées 6h30 post-transfection (Figure 54, vérification des ARN en annexe 5).

**Figure 54 : Impact de l'origine de la protéine NSP3 lors de la traduction d'ARNm rapporteur aux extrémités 3' variables.**

**(A)** 2µg de plasmides codant la protéine NSP3 de souche RF, RRV ou SA11 ont été transfectés par lipofection dans des cellules BSR-T7. Ces cellules ont ensuite été transfectées 18h plus tard par électroporation avec un mélange de 50ng d'ARN rapporteur Cap-Rluc, se terminant en 3' soit par GACC (en bleu), GGCC (en mauve), ou GAACC (en jaune), et 1µg d'ARN standard EMCV-Fluc. Les activités luciférase ont été mesurées 6h30 post-électroporation et les activités Rluc mesurées ont été rapportées à l'activité Fluc du standard. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de trois répétitions indépendantes. La valeur p du test de Student entre les conditions comparées est indiquée quand celles-ci sont significativement différentes. **(B)** Immunodétection des protéines NSP3 surexprimées. La valeur associée à chaque bande correspond à la moyenne de la fluorescence de NSP3 rapportée à celles de la GAPDH des trois répétitions.



Quelle que soit la souche de NSP3 utilisée, les protéines sont exprimées en quantités similaires (Figure 54B) et les activités luciférase des rapporteurs sont donc comparables. L'activité luciférase Renilla du rapporteur se finissant par GACC augmente très significativement (facteur 5x) en présence de NSP3 quelle que soit son origine (Figure 54A). Les protéines RRV et SA11 sont donc bien fonctionnelles. Le rapporteur se finissant par GGCC semble être mieux traduit en présence des protéines NSP3 des souches RRV ou SA11 qu'en présence de la protéine NSP3 RF. Cependant, dans les deux cas, ces augmentations ne sont pas statistiquement significatives par

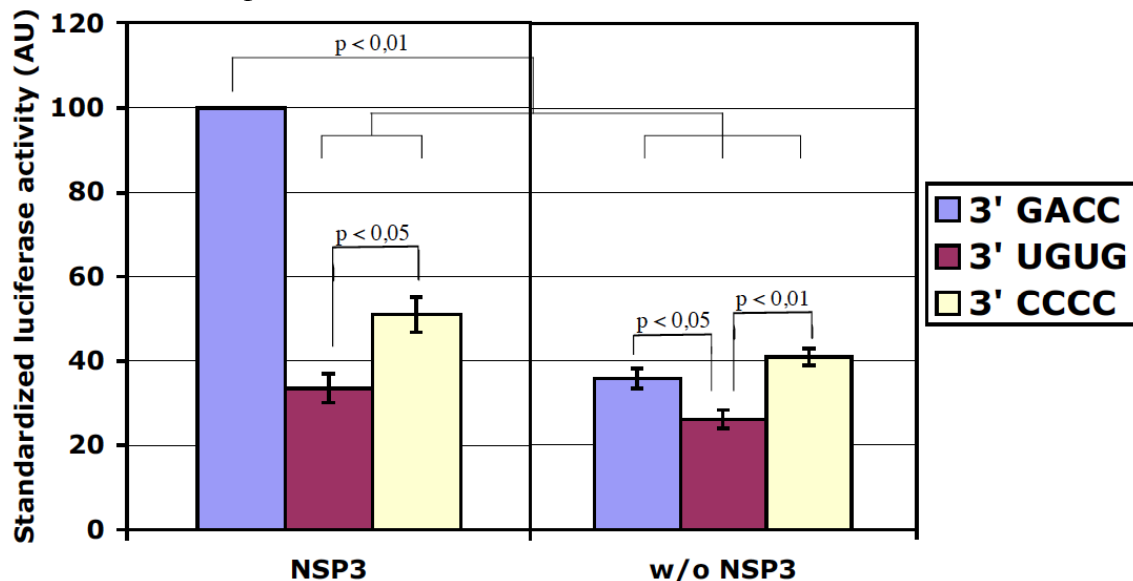
rapport à l'activité obtenue avec ce rapporteur et la protéine NSP3 de souche RF. De même, la comparaison des activités obtenues entre les ARN rapporteurs GAACC et GGCC pour les protéines NSP3 de souches RRV et SA11 ne sont pas significativement différentes. Dans ce système, l'extrémité 3' la plus favorable pour une traduction efficace de l'ARN de rotavirus est donc bien GACC quelle que soit l'origine de NSP3.

## 2/ Effet d'une extrémité 3' non reconnue pas NSP3 sur la traduction de l'ARN

Nous avons pu montrer précédemment que la protéine NSP3 est spécifique de l'extrémité 3' GACC, mais cela n'empêche pas certaines souches de rotavirus (adaptées à la culture) d'avoir des gènes avec des extrémités 3' non canoniques. Néanmoins, ces extrémités non canoniques présentent toutes deux cytosines en 3' : nous nous sommes demandés si, en plus d'être normalement reconnues par VP1 lors de la réplication, ses extrémités présentaient un avantage pour leur capacité à être traduit en absence de NSP3. De ce fait, nous avons effectué des tests d'activités de luciférase issues d'ARN rapporteurs Cap-Rluc- ayant la bonne extrémité 3' uguGACC ou se finissant par uguG (délétion de ACC) ou CCCC (substitution de uguG par CCCC, non reconnue par NSP3 (Poncet et al., 1994)), cela en présence ou non de NSP3 (Vérification des ARN en annexe 5).

### Figure 55 : Effet de l'extrémité 3' sur la traduction des ARNm de rotavirus.

Des cellules BSR-T7 ont été transfectées par lipofection avec 2µg de plasmides codant ou non NSP3 wt. 18h plus tard, les cellules ont été transfectées par électroporation avec un mélange de 50ng d'ARN rapporteur Cap-Rluc, dont l'extrémité 3' se finit soit par la séquence GACC (en bleu), UGUG (en mauve) ou CCCC (en jaune), et 1µg d'ARN standard EMCV-Fluc. Les activités luciférase ont été mesurées 6h30 post-transfection (trois expériences indépendantes). Les activités luciférase Renilla ont été rapportées aux activités luciférase Firefly issue de l'ARN standard EMCV-Fluc. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard (trois expériences indépendantes). La valeur p du test de Student est indiquée lorsqu'il y a une différence significative entre les conditions comparées.



Comme présentée sur la figure 55, une stimulation de plus de 2 fois de la traduction d'un rapporteur Cap-Rluc- se finissant par GACC est observée en présence de NSP3. On peut aussi observer une plus forte activité des rapporteurs se finissant par UGUG ou CCCC quand ils sont en présence de NSP3. Cependant, cette légère augmentation est à la limite d'être statistiquement significative. Cet effet de stimulation, par l'expression de NSP3, des ARN non polyadénylés ou ne comportant pas l'extrémité 3' de rotavirus GACC avait été observée en cellules infectées : ceci pourrait conforter l'hypothèse que la protéine NSP3 aurait un effet global sur la traduction des ARN non polyadénylés. Enfin, on observe une différence significative d'un facteur inférieur à 2 en absence de NSP3 entre les ARN rapporteurs Cap-Rluc-GACC ou Cap-Rluc-CCCC et l'ARN rapporteurs Cap-Rluc-UGUG. Cette différence est retrouvée entre l'ARN rapporteur Cap-Rluc-UGUG et Cap-Rluc-CCCC en présence de NSP3. Ainsi, les ARN se terminant par deux cytosines sont (légèrement) mieux traduits que l'ARN se terminant par UGUG.

Il peut être suggéré que l'extrémité 3' de rotavirus, en plus d'être reconnue par NSP3 lors de la traduction, et VP1 lors de la répllication, permettrait une meilleure stabilité de l'ARN dans la cellule en absence de NSP3 ou VP1. Cette extrémité 3' CC permettrait aux ARNm viraux de mieux résister à la dégradation dans l'attente de la synthèse des premières molécules de NSP3 ou VP1.

## **B/ Etude des régions non traduites (UTR) du gène 4 de rotavirus.**

Les ARNm de rotavirus sont composés de régions non traduites (UTR) de longueurs variables (Figure 22). Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au gène 4 codant la protéine structurale VP4 du virus : il présente une 5' UTR courte de 9 nucléotides.

On considère d'après des études de structure du ribosome que la distance entre la sortie de l'ARN du ribosome et le site P où se trouve le codon AUG lors de la fin de l'initiation de la traduction, est d'environ 12 nucléotides (Ingolia et al., 2009). Autrement dit, concernant les ARNm codant la protéine VP4, il ne peut pas y avoir d'étape de balayage avant la reconnaissance du codon d'initiation. Le codon d'initiation est-il reconnu directement par le ribosome, à l'aide des différents facteurs d'initiation de la traduction ? La traduction de ces ARN est-elle efficace même en ayant une 5' UTR aussi courte ? Est-ce un avantage pour la traduction dépendante de NSP3 ? Ce sont les questions que nous avons abordées en utilisant notre essai.

### **1/ Effet du 5'UTR sur la traduction d'ARN Rota ou poly(A)**

Pour étudier l'impact du 5' UTR sur la traduction d'un ARN rapporteur Cap-Rluc-gacc, la 5' UTR du gène 11 (22nt) de l'ARN rapporteur Rota utilisé en routine a été substituée par celle du gène 4 sauvage (9nt) ou mutée. La 5' UTR de gène 4 a été modifiée de plusieurs manières (Figure

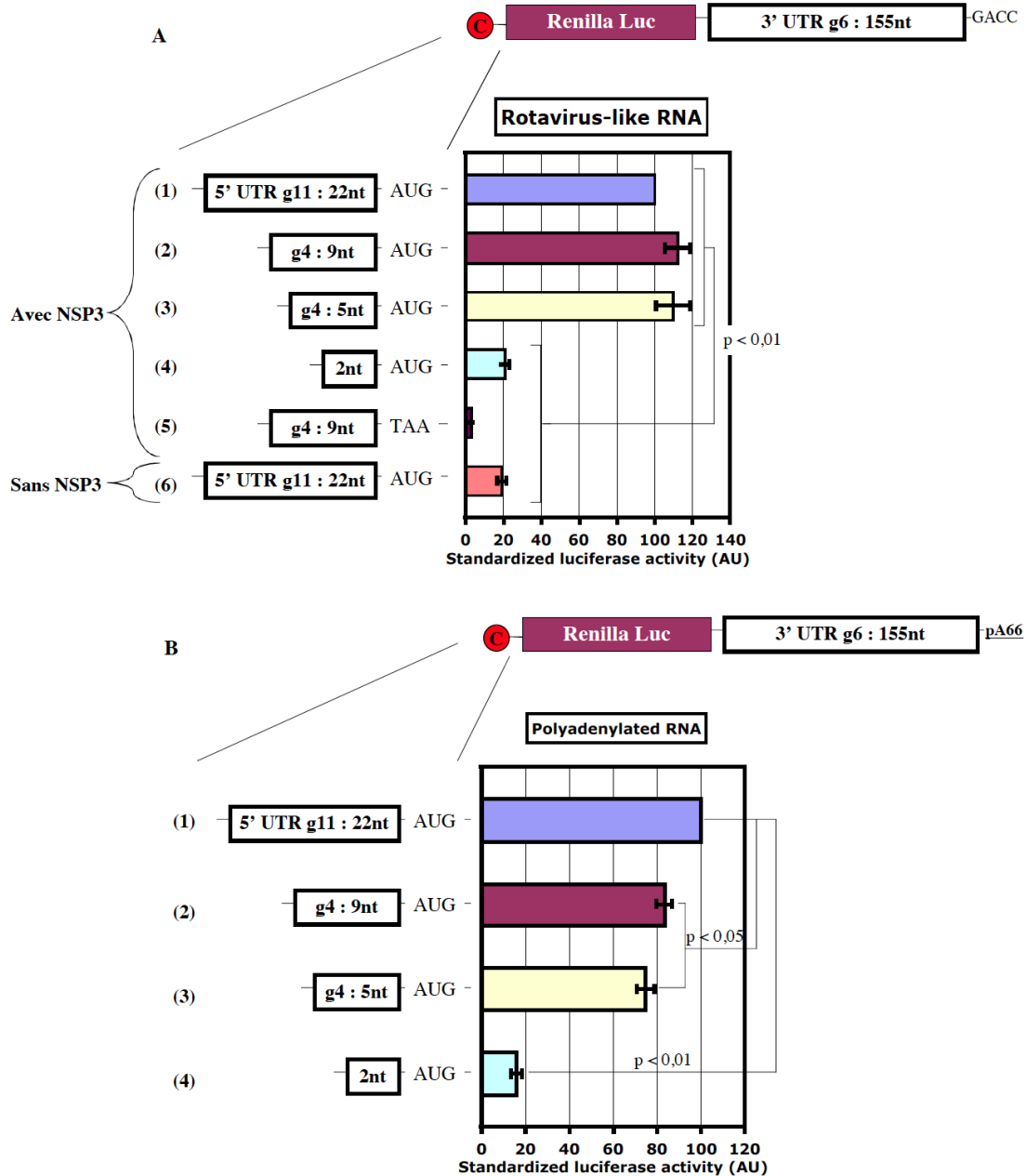
56A, détails des séquences en annexe 6) : en la raccourcissant à 5 ou 2 nucléotides afin de voir si une 5' UTR encore plus courte peut permettre une traduction de l'ARN rapporteur. Le codon d'initiation a aussi été muté en codon terminateur (TAA) afin de déterminer si c'est bien à partir de ce codon que démarre la traduction de l'ORF de la luciférase (Figure 56A). Certaines de ces constructions ont été testées avec une extrémité polyadénylée, dans le but de savoir si les effets observés étaient spécifiques d'une traduction dépendante de NSP3 (Vérification des ARN en annexe 7).

Les différentes constructions ont été testées et comparées à l'ARN rapporteur de référence. Sur la figure 56A sont présentés les résultats dans le cas d'ARN pris en charge par NSP3. Les ARN avec une extrémité 5' de gène 4 wt de 9 nucléotides ou raccourcie à 5 nucléotides sont aussi bien traduits que l'ARN rapporteur de référence dont le 5' est de 22 nucléotides (lignes 1, 2 et 3). Par contre, le fait de diminuer la longueur du 5' UTR à 2 nucléotides réduit la traduction de l'ARN rapporteur à un niveau équivalent à celui d'un ARN rapporteur de référence en absence de NSP3 (lignes 4 et 6). Enfin, c'est bien à partir du codon d'initiation, après les 9 nucléotides du 5' UTR, que démarre la traduction puisque sa substitution par un codon terminateur supprime l'activité luciférase issue de ce rapporteur (ligne 5). Une 5' UTR courte comme celle du gène 4 de rotavirus n'a donc pas d'impact négatif majeur sur la traduction dépendante de NSP3.

La figure 56B montre la même expérience mais dans le cadre d'ARN polyadénylés (Vérification des ARN en annexe 7). A l'inverse d'une traduction dépendante de NSP3, lorsque la 5' UTR est celle de gène 4 sauvage ou raccourcie à 5 nucléotides, il y a une diminution faible mais significative de la traduction de ces rapporteurs par rapport à celui de référence (lignes 1, 2 et 3). De ce résultat, on peut déduire que la traduction dépendante de NSP3 serait légèrement moins sensible au raccourcissement du 5' UTR que la traduction dépendante de la PABP. Cependant, le niveau de traduction des ARN rapporteurs poly(A) étant plus élevé que celui des ARN rapporteurs Rota (explicable en partie par le fait que toutes les cellules expriment la PABP alors que, compte tenu de l'efficacité de transfection, toutes n'expriment pas NSP3), de faibles écarts entre ARN rapporteurs avec des 5' UTR de longueurs différentes sont plus faciles à mettre en évidence lors d'une traduction dépendante de la PABP. Néanmoins, chaque type de traduction semble admettre une limite de 5 nucléotides pour leur 5' UTR.

**Figure 56 : Effet de la région 5' non codante (UTR) du gène 4 sur la traduction d'un ARN rapporteur de type rotavirus ou polyadénylé.**

**(A)** Représentation des ARN rapporteurs utilisés pour les tests de traduction dépendante de NSP3 : différentes 5' UTR ont été substituées et testées pour leur efficacité à stimuler la traduction de l'ARNm rapporteur de type rotavirus ou polyadénylé. Des cellules BSR-T7 ont été transfectées par lipofection avec 2µg de plasmide codant ou non NSP3, puis ont été transfectées 24h plus tard par électroporation avec un mélange de 50ng d'ARN rapporteur Cap-Rluc-gacc et 1µg d'ARN standard EMCV-Fluc. **(B)** Des cellules BSR-T7 ont été transfectées par électroporation avec un mélange de 50ng d'ARN rapporteur Cap-Rluc-pA(60) et 1µg d'ARN standard EMCV-Fluc. Dans les deux cas **(A)** et **(B)**, les activités luciférase ont été mesurées 6h30 post-électroporation, et les activités luciférase Renilla issues des rapporteurs ont été rapportées aux activités luciférase Firefly de l'ARN standard. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard à la moyenne pour trois expériences indépendantes. La valeur p du test de Student est indiquée lorsqu'il y a une différence significative entre les conditions comparées.



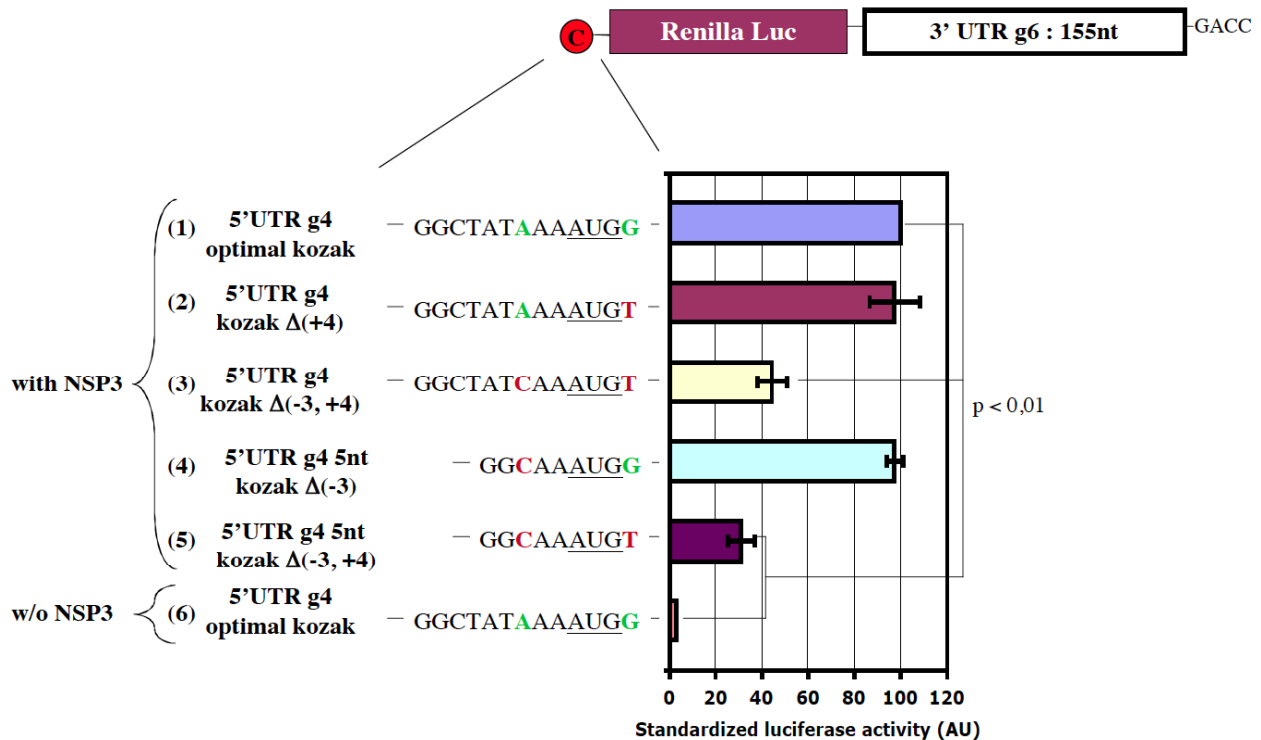
Etant donnée la longueur des 5' UTR testées, il ne peut y avoir de balayage classique allant du 5' vers le 3' pour reconnaître le codon d'initiation. Dans ces conditions, compte tenu de l'architecture du complexe d'initiation (PIC), soit le PIC est directement fixé sur le codon d'initiation ; soit le PIC est fixé après le codon d'initiation, puis est capable de balayer du 3' vers le 5' (phénomène de « backward excursion », (Matsuda and Dreher, 2006)) pour reconnaître le codon. Dans les deux cas, il faut admettre que l'ARN n'emprunte pas la totalité du canal ARN lorsque la sous-unité 60S est recrutée et se demander si le contexte environnant le codon d'initiation (règle de Kozak) joue toujours un rôle dans ce cas de figure. La règle de Kozak indique que le codon d'initiation est mieux reconnu par le ribosome dans le cas où les positions -3 et +4 (par rapport à l'AUG initiateur) sont respectivement une base purique et une guanosine (Kozak, 1989), ce qui est le cas de l'ARN rapporteur Rota g4 9nt (Figure 57 ligne 1) et de l'ARN « naturel » du gène 4 (genbank D16352).

Afin de répondre à cette question, les nucléotides en positions -3 et +4 par rapport au A du codon d'initiation AUG du rapporteur g4 9nt ont été mutés séparément ou ensemble sur la même séquence 5' UTR de gène 4 sauvage, ou sur la 5' UTR de gène 4 raccourcie à 5 nucléotides. Dans le cas de cette dernière construction, celle-ci est déjà avec un contexte imparfait, avec le nucléotide en position -3 défavorable (Figure 57, détails des séquences en annexe 6, vérification des ARN en annexe 7).

La figure 57 montre les effets des mutations des nucléotides en position -3 ou +4 : quelle que soit la longueur du 5' UTR, lorsque ces nucléotides sont mutés séparément, aucune diminution de la traduction du rapporteur n'est observée (lignes 1, 2 et 4). Par contre, le fait de muter simultanément, les deux nucléotides -3 et +4, a un effet négatif sur le niveau de traduction du rapporteur, avec une diminution d'un facteur 3 environ (lignes 3 et 5). Cependant, même avec un contexte défavorable pour la reconnaissance du codon d'initiation, la traduction reste relativement efficace comparé à l'activité d'un rapporteur en absence de NSP3 (ligne 6).

**Figure 57 : Effet du changement de contexte nucléotidique de la région 5' non codante du gène 4 sur la traduction d'ARNm rapporteur de type rotavirus.**

Schéma des ARN rapporteurs utilisés pour les tests de traduction dépendante de NSP3 : différentes 5' UTR, mutées ou non aux nucléotides -3 et/ou +4, ont été substituées et testées pour leur efficacité à stimuler la traduction de l'ARNm rapporteur de type rotavirus. Des cellules BSR-T7 ont été transfectées par lipofection par 2µg de plasmide codant ou non NSP3, puis ont été transfectées par électroporation avec un mélange de 50ng d'ARN rapporteur Cap-Rluc-gacc et 1µg d'ARN standard EMCV-Fluc. Les activités luciférase ont été mesurées 6h30 post-électroporation. Les activités luciférase Renilla issues des rapporteurs ont été rapportées aux activités luciférase Firefly. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard à la moyenne pour trois expériences indépendantes. La valeur p du test de Student est indiquée lorsqu'il y a une différence significative.



En conclusion, si ces extrémités 5' courtes n'impliquent pas de balayage par le PIC, le contexte nucléotidique a toujours son importance pour la bonne reconnaissance du codon d'initiation et pour induire une traduction efficace de l'ARN.

## 2/ Effet du 3' UTR sur la traduction d'ARN Rota

### a/ Substitution du 3' UTR de gène 6 par la 3' UTR de gène 4

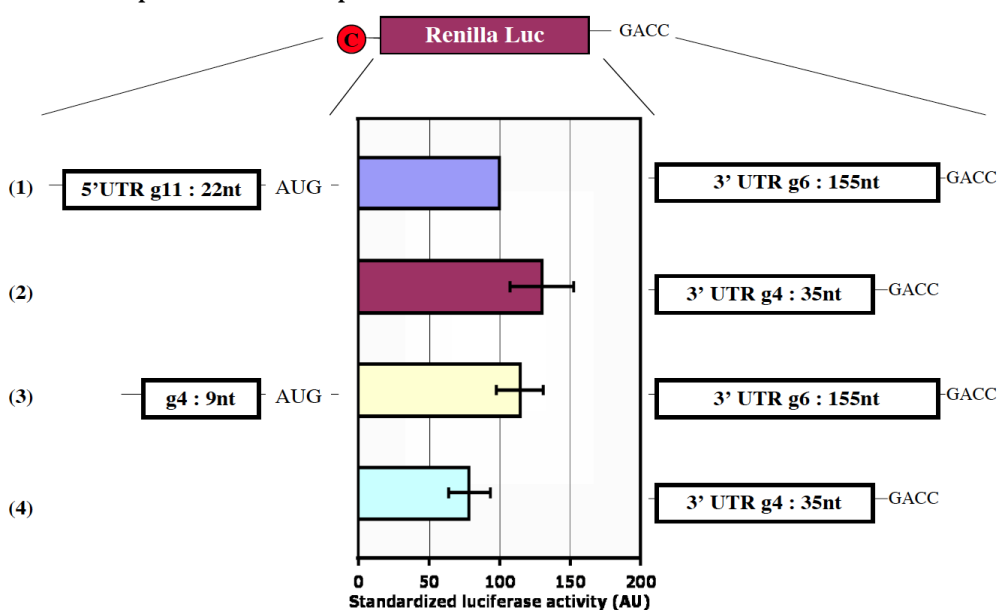
Nous avons pu montrer que la présence d'une 5' UTR aussi courte, que celui du gène 4, n'avait pas d'effet négatif sur la traduction d'un ARNm. Cependant, la 3' UTR associée à ces différentes constructions est celle du gène 6 de rotavirus, or il avait été montré que cette 3' UTR (155 nucléotides) pourrait avoir un effet stimulateur de la traduction dépendant de la séquence codante du gène rapporteur utilisé (Yang et al., 2004a). Afin de clarifier si un ARNm avec une 3' UTR courte, peut être traduit efficacement, nous avons substitué la 3' UTR de gène 6 par celle du



gène 4 (35 nucléotides) (figure 58, détail des séquences en annexe 6, vérification des ARN en annexe 8).

**Figure 58 : Effet du changement de la région 3' non codante du gène 6 par la région 3' non codante du gène 4.**

Représentation des ARN rapporteurs utilisés pour les tests de traduction dépendante de NSP3 : différentes 5' et 3' UTR ont été substituées et testées pour leur efficacité à stimuler la traduction de l'ARNm rapporteur de type rotavirus. Des cellules BSR-T7 ont été transfectées par lipofection avec 2µg de plasmide codant NSP3, puis ont été transfectées par électroporation avec un mélange de 50ng d'ARN rapporteur Cap-Rluc-gacc et 1µg d'ARN standard EMCV-Fluc. Les activités luciférase ont été mesurées 6h30 après électroporation, et les activités luciférase Renilla issues des rapporteurs ont été rapportées aux activités luciférase Firefly de l'ARN standard. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard sur la moyenne de trois expériences indépendantes.



La figure 58 montre les activités issues des ARNm rapporteurs utilisés précédemment avec une 3' UTR de gène 6, et celles issues des ARN rapporteurs avec une 3' UTR de gène 4. Il n'y a pas de différence significative entre les activités observées pour chaque rapporteur. De plus, substituer la 3' UTR de gène 6 par celle du gène 4, avec une 5' UTR de gène 11 en amont (lignes 1 et 2), ou seulement les 9 nucléotides du 5' UTR du gène 4 (lignes 3 et 4), ne modifie pas significativement le niveau de traduction de cet ARNm. Dans tous les cas, il n'y a pas d'effets majeurs dus au changement du 3' UTR, la 3' UTR de gène 6 n'a donc pas d'effet stimulateur fort sur la traduction des ARNm rapporteurs utilisés dans ces essais.

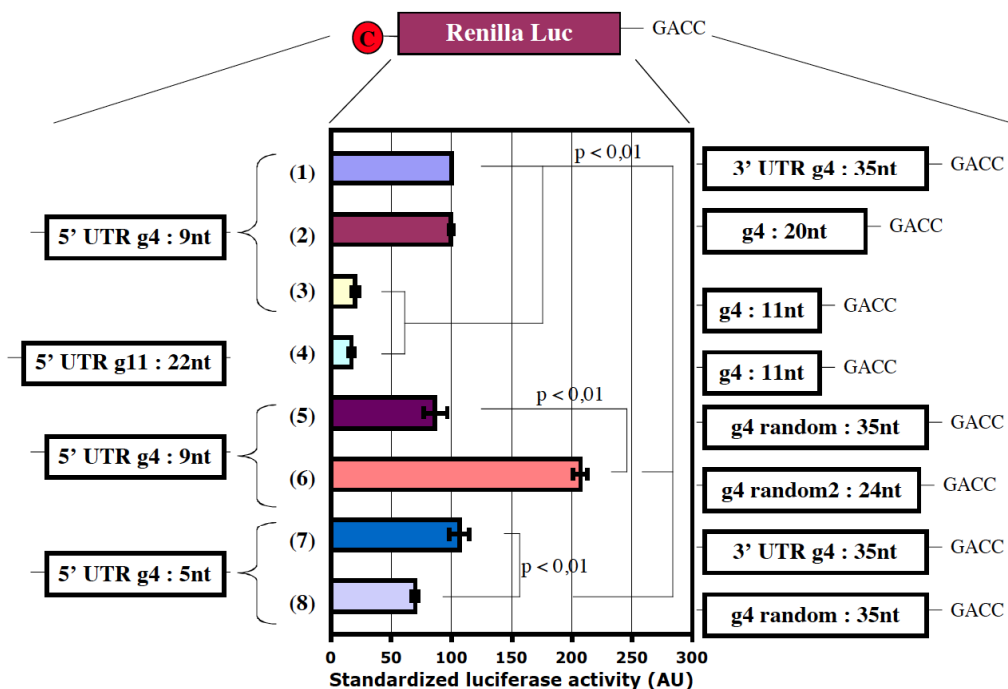
**b/ Effet du 3' UTR sur la traduction dépendante de NSP3.**

Dans cette seconde partie, nous nous sommes demandés si la 3' UTR pouvait aussi avoir un impact sur la traduction d'un ARNm rapporteur de type rotavirus avec une 5' UTR plus ou moins

courte. Nous avons pu voir que la substitution du 3' UTR de gène 6 par celle du gène 4 n'avait pas d'effets majeurs sur la traduction de l'ARNm. Nous avons voulu approfondir cette partie en mutant la 3' UTR de gène 4 en la raccourcissant ou en la substituant par une séquence « randomisée » (dont la composition nucléotidique est la même que celle du 3' UTR de gène 4, mais dont l'ordre nucléotidique diffère ; détails des séquences en annexe 6). Ces différentes 3' UTR ont été associées avec les 5' UTR du gène 11 ou du gène 4 afin de tester s'il y a un effet de la longueur de chaque extrémité non codante de l'ARNm sur la traduction (figure 59). L'ARN de référence utilisé ici est celui aux 5' et 3' UTR de gène 4 sauvage (Vérification des ARN en annexe 8).

**Figure 59 : Effet des mutations du 3' UTR de gène 4 sur la traduction d'un ARNm de type rotavirus.**

Représentation des ARN rapporteurs utilisés pour les tests de traduction dépendante de NSP3 : les 5' UTR du gène 4 ou 11 et 3' UTR du gène 4 (mutées ou non) ont été testées pour leur efficacité à stimuler la traduction de l'ARNm rapporteur de type rotavirus. Des cellules BSR-T7 ont été transfectées par lipofection avec 2µg de plasmide codant NSP3, puis ont été transfectées par électroporation avec un mélange de 50ng d'ARN rapporteurs Cap-Rluc-gacc et 1µg d'ARN standards EMCV-Fluc. Les activités luciférase ont été mesurées 6h30 post-électroporation, et les activités luciférase Renilla issues des ARN rapporteurs ont été rapportées aux activités luciférase Firefly de l'ARN standard. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard sur la moyenne de trois expériences indépendantes. La valeur p du test de Student est indiquée lorsqu'il y a une différence significative pour chaque condition comparée.



La figure 59 montre que lorsque la 3' UTR est raccourcie à 20nt, il n'y a pas d'impact sur l'activité luciférase (lignes 1 vs 2). Par contre, le fait de diminuer la longueur du 3' UTR à 11

nucléotides (lignes 1 vs 3 et 4), diminue l'activité luciférase par rapport au rapporteur de référence d'un facteur 5 et cela quel que soit la 5' UTR en amont (lignes 3 vs 4). Le fait de désordonner la séquence du 3' UTR de gène 4 n'induit pas de changement significatif sur l'activité luciférase observée (lignes 1 vs 5). Par contre, une augmentation significative (facteur x2) de l'activité est observée lorsque cette même séquence désordonnée est raccourcie à 24 nucléotides (lignes 5 vs 6). Enfin lorsque l'on associe une 5'UTR de gène 4, raccourcie à 5 nucléotides, avec une 3' UTR de gène 4 sauvage, aucune différence n'est observée avec le rapporteur de référence (lignes 7 vs 1). Par contre, le fait d'associer cette même 5' UTR de gène 4 raccourcie à 5 nucléotides avec la 3' UTR de gène 4 désordonné, réduit l'activité luciférase de ce rapporteur d'environ un tiers (lignes 8 vs 7).

Il est difficile de déduire une règle générale de ces expériences si ce n'est que les séquences 5' et 3' UTR d'un même gène ne sont pas forcément optimisées l'une pour l'autre pour la traduction (lignes 1 et 5) et il est même possible d'améliorer la traduction en raccourcissant et désordonnant la partie 3 UTR (lignes 1, 5 et 6). Il est très probable que des contraintes autres qu'une traduction efficace s'exercent sur ces séquences comme l'accessibilité pour la réplication ou la stabilité des ARN, et que la structure secondaire de l'ensemble du messager est importante. Afin de comprendre un peu mieux ces différences entre rapporteurs, j'ai utilisé les prédictions de structures secondaires des différents ARN rapporteurs, ceci afin de voir s'il est possible d'entrevoir des caractéristiques pouvant favoriser ou non la traduction d'un ARN.

### *c/ Prédictions de structure des ARN rapporteurs*

Des prédictions de structure d'ARN ont été effectuées sur le serveur de prédiction d'ARN mFold comprenant les séquences entières des ARN rapporteurs utilisés (figure 60). La structure la plus probable, c'est-à-dire la plus stable thermodynamiquement (première structure fournie par mFold), a été utilisée. D'après ces prédictions de structure, on peut trier les différents ARN rapporteurs en 3 classes :

- Ceux qui ont une stimulation de la traduction équivalente aux ARN rapporteurs de référence : ceux-ci présentent une accessibilité partielle à l'extrémité 3' GACC (c'est-à-dire que les bases CC ou ACC ne sont pas impliquées dans des liaisons permettant des structures secondaires d'ARN) (Figure 60A).
- Ceux qui présentent une augmentation ou une diminution de la traduction comparés aux ARN rapporteurs de référence : l'augmentation de la stimulation est corrélée avec une séquence 3' GACC complètement accessible pour NSP3 (Figure 60B structure n°6), alors qu'à l'inverse, une structure secondaire rendant la totalité de la séquence GACC inaccessible se traduit par une baisse de la traduction (Figure 60B structure n°7).

- Enfin ceux qui présentent une quasi-absence de stimulation de la traduction : ce sont les ARN rapporteurs avec une 3' UTR longue de 11nt qui présentent ce profil. Or, d'après les prédictions de structure, la séquence 3' GACC est accessible dans ces ARN (Figure 60C).

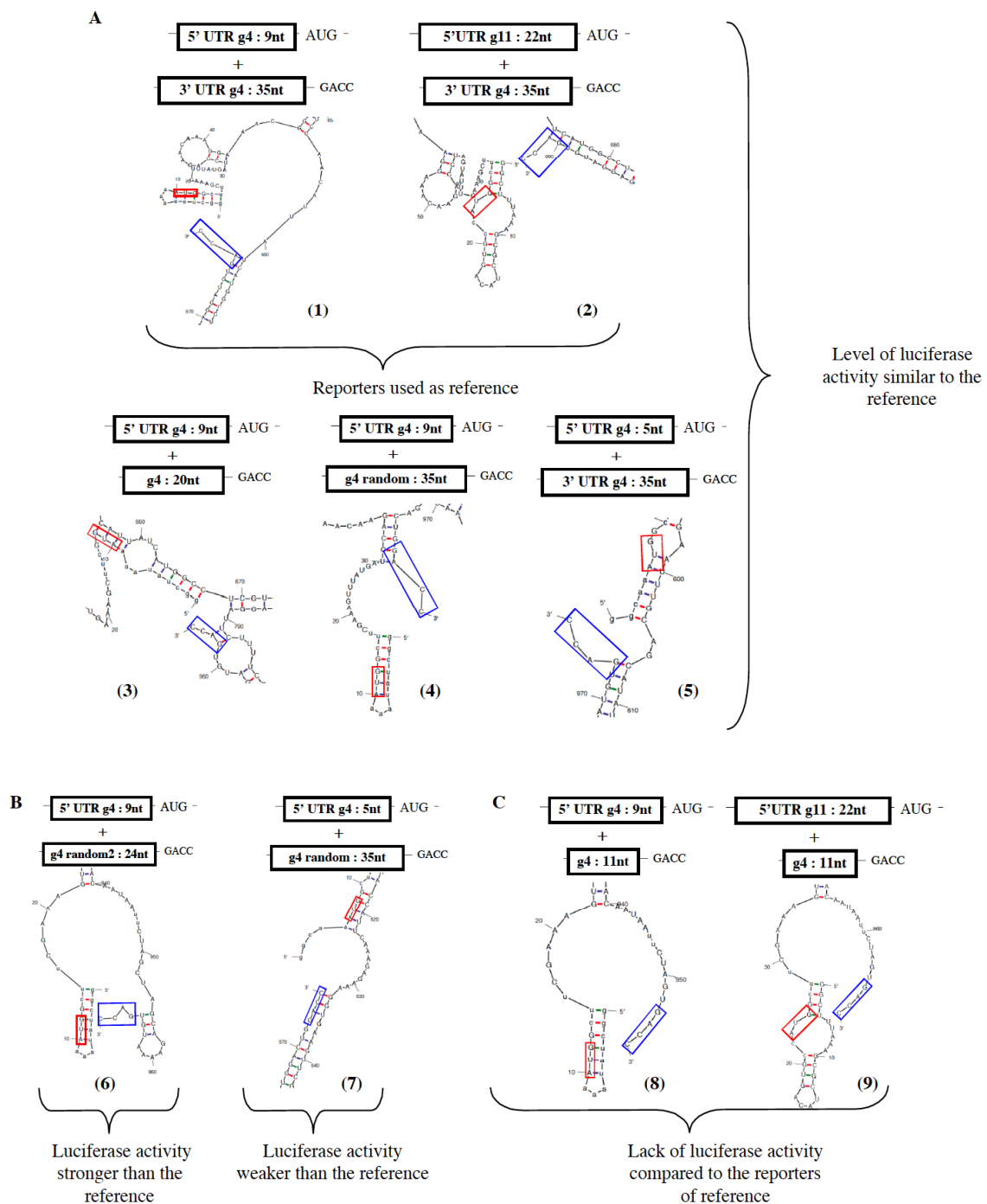
La 3' UTR de ces ARN rapporteurs fait 11nt de long, dont 7nt qui séparent le codon STOP de la séquence consensus GACC reconnue et protégée par NSP3. Il a été montré que 9nt séparent le site A du ribosome (Ingolia et al., 2009), dans lequel se trouve le codon de terminaison lorsque le ribosome a fini de traduire l'ORF, et l'entrée du ribosome. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer la mauvaise traduction des ARNm ayant une 3' UTR de 11 nucléotides :

- Soit la présence de NSP3 à l'extrémité 3' empêche le codon de terminaison de se placer dans le site A du premier ribosome ayant atteint la fin de l'ORF en bloquant ce dernier à l'extrémité de l'ARN et provoquant un « embouteillage » de ribosomes. Les peptides restent alors accrochés aux ARNt dans le ribosome et l'ensemble ARNm et peptide est dégradé par le système de surveillance No-Go mRNA Decay (NGD), un système cellulaire qui permet la détection et la dégradation des ARNm où les ribosomes sont bloqués lors de la traduction.
- Soit à l'inverse, NSP3 est éjectée par l'arrivée du premier ribosome ayant atteint la fin de l'ORF rendant l'extrémité 3' accessible au système de dégradation cellulaire en 3', ou exigeant une nouvelle étape de fixation de NSP3 à l'ARN et ralentissant ainsi les cycles d'initiations.

Dans les deux cas, cela conduit une faible efficacité de traduction d'un ARN rapporteur avec une 3' UTR trop courte. En conclusion, si la taille des UTR en 5' et 3' n'a pas, au-delà d'une certaine limite, d'influence sur la traduction, l'accessibilité de la séquence GACC présente un effet très marqué sur l'efficacité de traduction des ARNm viraux.

**Figure 60 : Prédiction de structures des différents rapporteurs ARN.**

La structure de différents ARN rapporteurs avec différentes 5' et 3' UTR a été prédite par le programme mFold sur le serveur de prédiction mFold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form> avec les conditions par défaut). Les encadrés rouges correspondent aux codons d'initiation de l'ARN, les encadrés bleus correspondent aux extrémités 3' GACC. **(A)** Les ARN rapporteurs qui présentent une activité luciférase équivalente aux ARN rapporteurs de référence. **(B)** Les ARN rapporteurs présentant une augmentation ou une diminution de l'activité luciférase par rapport aux ARN rapporteurs de référence. **(C)** Les ARN rapporteurs ne présentant quasiment plus d'activité luciférase comparé aux ARN rapporteurs de référence.



## **Chapitre 4 : Discussion**

Le rôle de la protéine NSP3 dans la traduction des ARNm de rotavirus (Montero et al., 2006) et dans l'inhibition de la traduction des ARN cellulaires ou polyadénylés est controversé (Rubio et al., 2013). Mon travail de thèse m'a permis de confirmer le rôle de NSP3 dans la stimulation de la traduction des ARN de rotavirus, mais aussi de soulever de nouvelles questions. A l'aide de différents systèmes, j'ai pu étudier l'effet de NSP3 au cours de l'infection et hors infection sur la traduction d'ARN de type rotavirus, non rotavirus ou polyadénylés. En outre, via ces mêmes systèmes, j'ai pu étudier certaines caractéristiques des ARN de rotavirus (extrémité 3', UTR) qui ont permis de mieux définir les mécanismes de traduction dépendants de NSP3.

### **I/ Effet de NSP3 sur la stabilité des ARN transfectés pendant ou hors infection**

Afin de vérifier si l'expression de NSP3 affecte la stabilité des ARN rapporteurs avec une extrémité 3' Rota (se finissant par GACC), trois types d'expériences ont été conduites.

#### **A/ Electroporation d'ARN rapporteurs Rota dans des cellules infectées ou non par le rotavirus.**

Dans le cas de cellules infectées, la stabilité des ARN n'a pas pu être évaluée puisque la quantité d'ARN présent 6 heures après transfection est, après normalisation par rapport à l'ARN cellulaire GAPDH, supérieure à la quantité d'ARN électroporés. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer l'augmentation des ARN autre que les ARN rapporteurs Rota :

- Les ARN transfectés sont répliqués : si cela pourrait être possible avec l'ARN rapporteur Rota, c'est peu probable concernant les ARN rapporteurs Nona ou poly(A) puisque ceux-ci ne disposent pas de tous les signaux nécessaires pour être répliqués et encapsidés.
- La mortalité cellulaire est plus élevée pour les cellules électroporées n'ayant pas reçu d'ARN : si les cellules n'ayant pas reçu d'ARN dégradent leurs ARN cellulaires préférentiellement, alors la proportion d'ARN rapporteurs parmi les ARN totaux (ou par rapport aux ARN GAPDH) augmente.

Les cycles seuils (« Cycle threshold » ou Ct) observés pour chaque condition appuient cette hypothèse puisque les Ct des ARN transfectés augmentent (3 à 4 Ct) moins fortement que ceux des ARN de la GAPDH (5 à 6 Ct). Ainsi, l'ARN de GAPDH, utilisé comme normalisateur, n'est pas

constant au cours de l'infection ce qui expliquerait pourquoi nous n'observons pas de diminution des quantités d'ARN électroporés dans les cellules infectées à T6. Ce résultat pose évidemment la question de l'utilisation de cet ARN cellulaire dans la normalisation.

Il n'est donc pas possible d'étudier la stabilité des ARN dans les cellules infectées par la méthode de RT-qPCR. Une autre méthode de transfection des ARN moins « agressive » comme la lipofection pourrait peut être permettre d'étudier ces phénomènes. Cependant, la lipofection a été montrée comme n'étant pas une technique fiable pour étudier la stabilité des ARN (Barreau et al., 2006). Il est donc nécessaire de mettre au point d'autres outils d'introduction d'ARN rapporteurs Rota et de mesure de ces ARN transfectés dans les cellules infectées afin d'étudier la stabilité des ARN.

### **B/ Electroporation d'ARN rapporteurs Rota dans des cellules exprimant NSP3 de façon transitoire**

Dans le cas des cellules (BSR-T7) exprimant la protéine NSP3 de façon transitoire, une disparition très rapide des ARN a été observée quelle que soit l'extrémité des ARN. Ce résultat couplé à l'augmentation importante de l'activité luciférase avec les ARN rapporteurs Rota dans ces cellules montre que soit la protection de l'ARN de la dégradation n'est pas le facteur le plus important dans le fonctionnement de NSP3, soit seule une très faible fraction de l'ARN transfectée est protégée par NSP3 et n'est pas mesurable par RT-qPCR.

### **C/ Electroporation d'ARN rapporteurs Rota dans des cellules exprimant NSP3 de façon transitoire**

Dans le cas des cellules exprimant NSP3 de façon constitutive (C20bis), nous avons observé une disparition plus rapide que dans les cellules mères (MA104), de tous les ARN électroporés (avec même une disparition encore plus importante de l'ARN rapporteur Rota, figure 43A). Il peut être suggéré, pour expliquer ce phénomène, que les systèmes de dégradation des ARN sont aussi plus actifs en cellules C20bis qu'en cellules MA104. Est-ce que ce phénomène résulte de l'expression de NSP3 ou est-ce un phénomène clonale reste à établir. Mais l'augmentation de la traduction des ARN rapporteurs Rota est sans commune mesure (facteur 100x) avec la modification de la stabilité des ARN.

## **II/ Effet de l'état physiologique des cellules sur la traduction des ARN transfectés**

Les expériences d'électroporation en cellules infectées ou en lignée de cellules ont été faites à partir des mêmes lots d'ARN synthétisés *in vitro* et des mêmes types de cellules, néanmoins, pour

les témoins négatifs (cellules non infectées (« mock ») et cellules MA104 « mères »), des différences sont observées vis-à-vis du comportement des ARN transfectés, ceux-ci étant plus stables dans les cellules « mock » (Figures 41 et 43A). Une différence de protocole entre les deux types d'expériences est notable. Dans le cadre d'infection, les cellules MA104 sont mises, la veille, dans du milieu sans sérum afin de ne pas inhiber la trypsine nécessaire à l'infection ; alors que les cellules MA104, ainsi que les cellules C20bis utilisées pour étudier l'effet de la protéine NSP3 seule, sont cultivées en présence de sérum au moment des électroporations. Le sérum a pour effet de stimuler le métabolisme et donc la croissance des cellules : de fait, la déprivation des cellules en sérum pourrait contribuer à l'inhibition des systèmes de dégradation des ARN. Cela expliquerait ainsi que les ARN rapporteurs transfectés soient mieux maintenus dans les cellules MA104 « mock » utilisées lors des infections que dans les MA104 « mères » utilisées en contrôle avec les cellules C20bis.

### III/ Effet de l'infection sur la traduction des ARN

#### A/ L'infection stimule-t-elle la traduction des ARN viraux ?

Les résultats obtenus par électroporation d'ARN rapporteurs « Rota » dans des cellules infectées par les souches RRV ou RF montrent très clairement que l'infection stimule la traduction des ARN viraux (Figure 42). La traduction de l'ARN rapporteur Rota (normalisée par la quantité d'ARN électroporée (T0)) est stimulée de plus de 20 fois par l'infection avec le virus de souche RF et de plus de 40 fois par le virus de souche RRV. Cette stimulation est dépendante de l'extrémité 3' de l'ARN puisque seule une stimulation de 2 à 4 fois est obtenue avec l'ARN « Nona » quelle que soit la souche virale (Figure 42).

Le fait que nous ayons pu récapituler une stimulation de la traduction des ARN rapporteurs Rota d'un niveau équivalent (Facteur >100) dans les cellules exprimant la protéine NSP3 seule montre bien que cette dernière seule est responsable de la stimulation de la traduction des ARNm viraux (Figure 43B). De plus, l'utilisation de mutants de NSP3 dans le système de cellules BSR-T7 montre bien que la seule stabilisation des ARN par le domaine de fixation à l'ARN de NSP3 n'est pas suffisante pour rendre compte de la totalité de l'effet stimulateur de NSP3 (Figures 47 et 51). L'hypothèse que les deux domaines de NSP3 fonctionnent de façon indépendante (Montero et al., 2006) et que NSP3 stimule la traduction simplement par stabilisation des ARN viraux n'est donc pas vérifiée.

Il faut noter que le degré de stimulation de la traduction des ARN Rota est différent entre virus de souche RF et RRV (facteur 24 et 44 respectivement) alors qu'aucune différence notable de stimulation n'a été observée avec les protéines NSP3 de chaque souche dans les cellules BSR-T7



(Figure 54). Soit notre système d'expression avec les cellules BSR-T7 n'est pas capable de détecter de subtiles différences entre les deux protéines NSP3 de différentes origines, soit d'autres facteurs viraux interviennent dans la régulation de la traduction des ARN de rotavirus. L'utilisation de virus mono-réassortants entre virus RRV et RF se différenciant uniquement par l'origine du gène 7 (soit gène 7 « RRV » associé avec les gènes « RF », ou inversement) pourra répondre à cette question.

Il convient enfin de noter les différences de stimulation de la traduction d'un ARN rapporteur Rota selon le système utilisé. Ainsi, pour une protéine NSP3 de souche RF, on peut observer une stimulation de 20 fois en cellules infectées, de 100 fois en cellules C20bis, et de 5 à 35 fois en cellules BSR-T7. Ces différences peuvent être expliquées de plusieurs manières. Dans le cas des cellules infectées, nous avons une certaine mortalité cellulaire. De fait, les cellules étant lysées et les activités luciférase étant mesurées à partir d'un même volume, il n'est pas impossible que le nombre de cellules lysées soit plus important en cellules C20bis ce qui se traduirait par une stimulation apparente plus forte en cellules C20bis qu'en cellules infectées. Dans le cas des cellules BSR-T7, deux phénomènes sont à prendre en compte, le premier étant l'étape de transfection par lipofection (pour l'expression de NSP3) puis électroporation (pour l'ARN rapporteur) : ainsi, toutes les cellules qui sont électroporées avec l'ARN rapporteur n'expriment pas nécessairement la protéine NSP3. Le second phénomène à prendre en compte est le niveau d'expression de NSP3 qui varie selon les cas : notamment, j'ai pu me rendre compte tardivement que l'ancienneté des cellules joue sur la quantité de NSP3 exprimées. De fait, cela explique la variabilité de la stimulation par NSP3 observées entre les expériences faites en BSR-T7 (Figures 45, 46, 47, 54 et 55).

Dans les expériences présentées, nous avons pu montrer la spécificité de la stimulation de la traduction de la traduction par NSP3, notamment en utilisant un ARN rapporteur Nona, ne se différenciant de l'ARN rapporteur Rota que par l'absence d'extrémité 3' GACC. Ainsi, j'ai pu montrer l'importance capitale de l'extrémité 3' pour la stimulation de la traduction des ARNm de rotavirus.

Récemment, la stimulation de la traduction des ARN rapporteurs Rota par l'extrémité 3' GACC dans les cellules infectées a aussi été remise en cause (Rubio et al., 2013). Dans les mains des auteurs, l'infection stimule bien la traduction de l'ARN rapporteur Rota transfecté de 70 fois comparée à des cellules non infectées, mais une augmentation de la traduction de l'ARN rapporteur poly(A) est observée. Les auteurs concluent qu'il n'y a pas d'avantages amenés par les UTR viraux (issus du gène 6 de rotavirus) sur la traduction des ARN rapporteurs Rota comparé à des ARN rapporteurs poly(A) comportant les UTR cellulaires (issus du gène de la  $\beta$ -globine de xénope) et que l'infection par le rotavirus conduit à un changement dans la machinerie de traduction qui

améliore la traduction de tous les ARNm confondus (Rubio et al., 2013). Il faut néanmoins souligner que cette conclusion est basée sur l'utilisation d'ARN rapporteurs se différenciant non seulement sur les UTR utilisés mais aussi pour le gène servant de rapporteur (l'ARN rapporteur Rota comporte le gène de la luciférase Firefly, alors que l'ARN rapporteur poly(A) celui de la luciférase Renilla). De plus, aucun ARN rapporteur « contrôle » de type Nona, c'est-à-dire reconnu ni par NSP3 ni par la PABP, n'a été utilisé. Nous avons tenté de reproduire ces expériences au laboratoire : aucune stimulation de la traduction des ARN rapporteurs poly(A) n'a été détectée dans les cellules infectées quel que soit le mode de transfection utilisé.

### **B/ L'infection bloque-t-elle la traduction des ARN poly(A)?**

La traduction des ARN rapporteurs polyadénylés introduits dans les cellules infectées présente des résultats divergents selon la souche de rotavirus et le mode de transfection utilisés. Alors que nous avons observé une inhibition de la traduction avec un rotavirus de souche RF (5 fois moins de traduction après normalisation T0), celle-ci est peu ou moins marquée avec le rotavirus de souche RRV (1,7 fois moins). Le résultat obtenu avec la souche RRV n'est pas non plus en accord avec les résultats de Rubio *et al.* qui ont montré que non seulement la traduction d'ARN poly(A) lipofectés dans des cellules infectées n'était pas inhibée, mais qu'à l'inverse leur traduction est stimulée (de 70 fois) par l'infection de la même façon que les ARN rapporteurs Rota (Rubio et al., 2013).

Cette différence de résultat est probablement liée en partie à la méthode de transfection utilisée. En effet, des expériences préliminaires de transfections par lipofection de cellules infectées par la souche RF ou RRV ont été effectuées au laboratoire avec les mêmes ARN rapporteurs polyadénylé et Rota que ceux utilisés dans les expériences présentées dans ce travail de thèse. Aucune diminution ni augmentation de la traduction des ARN rapporteurs poly(A) n'a alors été observée (P.Vende communication personnelle) lors de l'infection par le rotavirus de souche RF ou RRV.

Si l'on admet que l'inhibition de la traduction est liée à un arrêt de l'export des ARN du noyau comme proposé par Rubio *et al.* (Rubio et al., 2013), alors il faut aussi admettre que l'électroporation délivre les ARN dans le noyau ou dans un compartiment cellulaire où la traduction est affectée par l'infection. Ce phénomène de traduction régionalisée est par exemple à l'origine d'une efficacité différente de certains miRNA pour les ARNm traduits sur la membrane du réticulum endoplasmique en comparaison aux mêmes ARNm traduits sur les ribosomes « libres » (Brodersen et al., 2012; Stalder et al., 2013). La localisation nucléaire des ARN électroporés ne semble pas en accord avec le mécanisme d'électroporation (ou électroperméabilisation) qui est

supposé « ouvrir » la membrane plasmique et permettre l'entrée directe dans le cytoplasme (Escoffre et al., 2009). D'autre part, elle n'explique pas la différence de résultats obtenus avec la souche RRV suivant le mode de transfection. Une dernière possibilité serait que l'électroporation affecte les cellules infectées différemment suivant le virus : par exemple, si le taux de mortalité après électroporation est différent entre cellules infectées par la souche RF et la souche RRV. Il reste à élucider pourquoi les deux souches virales se comportent différemment.

### C/ La protéine NSP3 bloque-t-elle la traduction dépendante de la PABP ?

Si l'utilisation d'une lignée de cellules exprimant NSP3 de façon constitutive (C20bis) a permis de retrouver la stimulation de la traduction des ARN de rotavirus (stimulation d'un facteur 125) sans stabilisation particulière des ARN rapporteurs Rota, nous n'avons pas observé d'inhibition de la traduction des ARN polyadénylés et non rota (Nona) avec ces cellules. Etrangement, la traduction des ARN polyadénylés et Nona (non rotavirus) est même légèrement plus forte (facteur 2 à 3) dans la lignée de cellules C20bis que dans les cellules MA104 après normalisation par rapport aux quantités d'ARN transfectés (Figure 43B).

Plusieurs explications sont possibles :

1. NSP3 n'est pas seule responsable de l'inhibition de la traduction des ARNm cellulaires : un facteur viral (protéine ou ARN) ou cellulaire qui serait nécessaire lors de l'infection. Les expériences d'électroporation d'ARNm poly(A) dans les cellules infectées par le rotavirus de souche RF vont dans ce sens puisque, dans ce cas, il y a bien inhibition de la traduction des ARN poly(A).
2. NSP3 serait responsable de l'inhibition de la traduction cellulaire, mais du fait de sa toxicité pour la cellule, elle est trop faiblement exprimée dans les cellules C20bis pour reproduire une inhibition. Des expériences récentes au laboratoire montrent que l'expression d'un gène rapporteur poly(A) intégré dans le génome de cellules MA104 est réduite de 50% 3 à 4h après infection (à MOI de 10 par le virus de souche RF) (P.Vende, Données non présentées), alors que dans notre ligné C20bis, le niveau d'expression de NSP3 dans les cellules C20bis a été estimé équivalent à la quantité de protéine NSP3 présente entre 1h et 2h après infection (à MOI de 10 par le virus de souche RF). Il faut certainement une quantité importante de NSP3 pour pouvoir évincer la PABP des complexes eIF4F, la PABP étant une protéine très abondante, soit sous forme fixée aux ARN, soit séquestrée par ses inhibiteurs

- (PAIP2). Cette forme séquestrée constitue une fraction de PABP pouvant être mobilisée à nouveau vers la traduction en cas de besoin (Yoshida et al., 2006).
3. Une autre hypothèse est que la protéine NSP3 nécessite la présence d'ARN viraux pour inhiber la traduction poly(A). Dans ce cas, l'inhibition proviendrait du recrutement d'un facteur cellulaire de traduction dont la quantité deviendrait alors limitante en regard de la quantité d'ARN poly(A) à traduire.
  4. Une dernière hypothèse a été récemment évoquée, l'inhibition de la traduction cellulaire se ferait via le blocage de l'export des ARNm poly(A). Cette hypothèse a l'avantage d'expliquer la faible inhibition de la traduction des ARNm poly(A) dans les cellules infectées par le virus RRV. Ce blocage de l'export pourrait se faire par la relocalisation de la PABP dans le noyau de la cellule au cours de l'infection ; il a été montré que l'export de la PABP du noyau était lié à l'export des ARNm (Burgess et al., 2011). Que l'accumulation de la PABP dans le noyau soit la cause ou la conséquence de ce blocage reste à déterminer.

En ce qui concerne l'augmentation de la traduction des ARN rapporteurs Nona et poly(A) observée dans la lignée C20bis en l'absence d'infection, celle-ci pourrait être due paradoxalement à l'expression de NSP3. Une première hypothèse est que NSP3 présente une affinité faible mais non spécifique pour les ARN : une interaction, même brève, avec un ARN permettant alors son recrutement par la machinerie de traduction. Une explication similaire avait été évoquée pour rendre compte d'une stimulation de la traduction non spécifique des ARN observés dans un système de traduction *in vitro* auquel était ajouté de la protéine NSP3 recombinante (Vende et al., 2000).

Mais une hypothèse plus provocatrice est que l'occupation du site de fixation de la PABP sur eIF4G par NSP3 pourrait rendre disponible pour la traduction des molécules eIF4G normalement stockées sous formes inactives (d'une façon similaire à la PABP avec la PAIP2 (Yoshida et al., 2006)) et ainsi perturber la régulation de la traduction en réduisant la compétition entre ARN poly(A) et non poly(A). Il a été décrit que, chez la levure, la suppression des systèmes de surveillance des ARN non polyadénylés abolissait la compétition entre ARN poly(A) et non poly(A), et permettrait la traduction efficace des ARN non poly(A) introduits dans la cellules (Searfoss and Wickner, 2000).

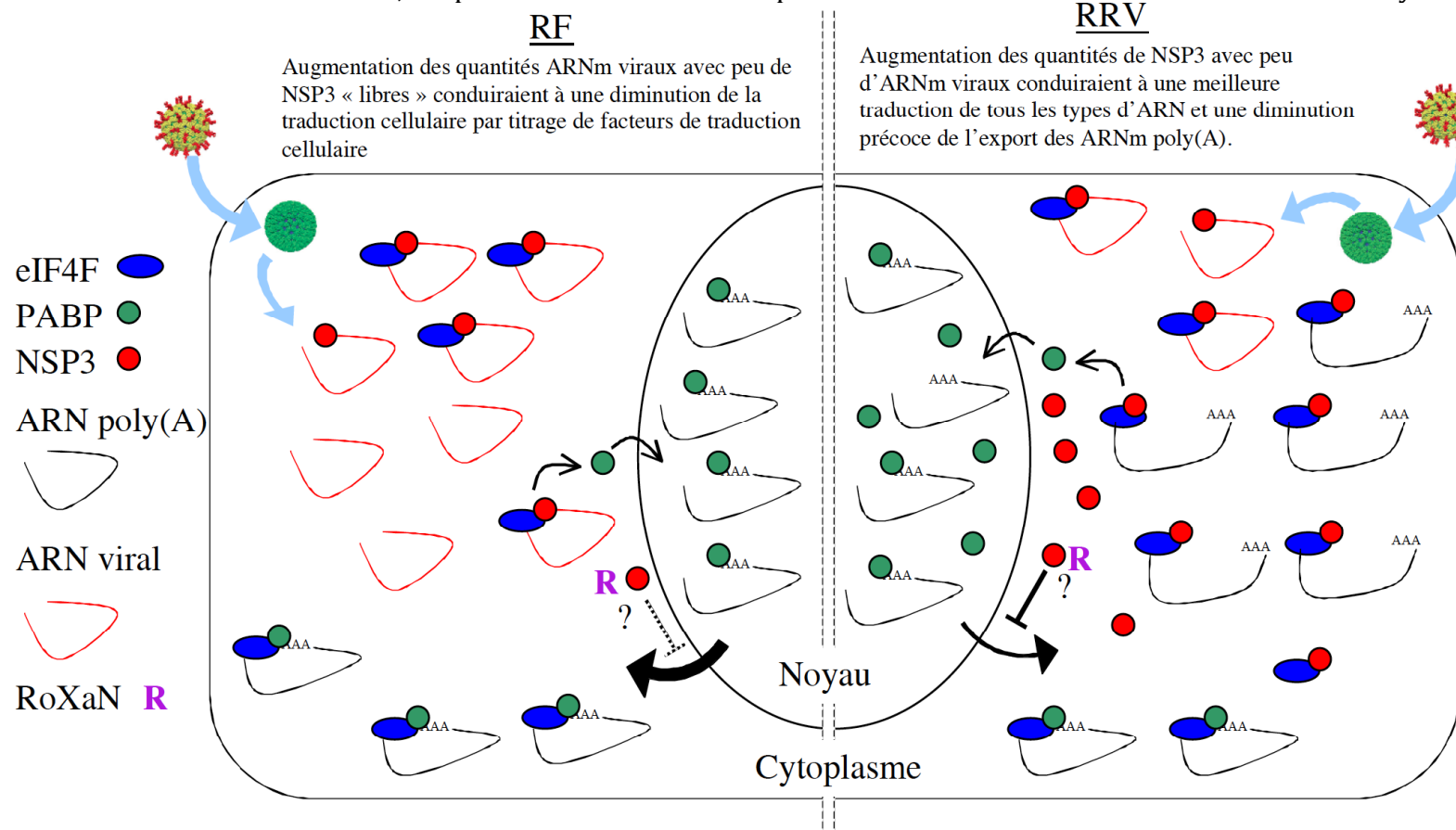
Comment réconcilier ces observations contradictoires ; d'un côté, l'expression de NSP3 seule conduirait à une augmentation globale de la traduction (y compris des ARN poly(A)) dans la lignée de cellules C20bis ; alors qu'il y aurait une inhibition de la traduction des ARN poly(A) lors de l'infection par le rotavirus?

Compte tenu de l'inhibition de la traduction poly(A) obtenue par addition de la partie de NSP3 interagissant avec eIF4G1 (Vende et al., 2000), de la synergie entre coiffe et poly(A), il est difficile de considérer que l'éviction de la PABP des complexes eIF4F n'a aucun rôle dans l'inhibition de la traduction des ARN cellulaires au cours de l'infection par le rotavirus. Il est possible de réconcilier ces hypothèses en considérant que l'inhibition de la traduction poly(A) se fait de plusieurs manières : d'une part, l'éviction de la PABP par NSP3 entraîne la relocalisation de la PABP dans le noyau entraînant un blocage de l'export des ARN poly(A) cellulaires. D'autre part, une quantité croissante de protéines NSP3 dans le cytoplasme, ajoutée à la raréfaction des ARN poly(A) et à la mobilisation des facteurs de traduction par NSP3 pour la traduction des ARNm viraux (eux aussi en quantité croissante) conduit rapidement au blocage de la traduction des ARNm cellulaires. Par contre, lors de l'expression de NSP3 en absence d'ARN de rotavirus, il y aurait une stimulation généralisée de la traduction soit par mobilisation de facteur eIF4G inactif soit par interaction ARN-NSP3 non spécifique (cf plus haut). Ainsi, les différences observées entre la souche RF et RRV pourraient provenir d'une différence de ratio NSP3/ARN viraux. Une souche (RRV) produisant rapidement une grande quantité de NSP3 mais une faible quantité d'ARN viraux affecterait la traduction cellulaire tardivement suite à la raréfaction des ARN poly(A) via le blocage de l'export nucléaire (Figure 61). Une souche (RF) produisant rapidement beaucoup d'ARN viraux bloquerait la traduction cellulaire rapidement par recrutement de facteur(s) de traduction, présent(s) en quantité limitante, le blocage de l'export des ARN cellulaires du noyau n'intervenant que plus tard (Figure 61). Ce schéma est corroboré par des données préliminaires montrant que la traduction d'un ARN, non coiffé avec un IRES d'EMCV en 5' et non polyadénylé en 3', est aussi affectée lors de l'infection par le rotavirus de souche RF alors qu'aucun effet ne semble observé avec celui de souche RRV (Données non présentées).

Une étude cinétique et quantitative de ces différents paramètres serait nécessaire pour établir le bien-fondé de ce modèle. De même, des travaux sont actuellement en cours afin de déterminer si c'est bien la protéine NSP3 qui est responsable de ces différents phénomènes ; notamment via l'utilisation de virus réassortant possédant le gène 7 issue d'une souche différentes des autres gènes. Il serait aussi intéressant de savoir l'impact que pourrait avoir le facteur RoXaN, dont il a été démontré comme pouvant être impliqué dans la relocalisation de la PABP au noyau et capable d'interagir avec NSP3 (Harb et al., 2008).

**Figure 61 : Modèles d'inhibition de la traduction cellulaire lors d'infection par le rotavirus.**

Lors de l'infection par le rotavirus de souche RF, celui-ci produirait une forte quantité d'ARNm viraux mais proportionnellement peu de protéines NSP3 (pas de NSP3 « libres »). La présence d'autant d'ARNm viraux permettrait la récupération de la machinerie de traduction au détriment des ARNm poly(A) provoquant une inhibition rapide de la traduction cellulaire. Lors de l'infection par le rotavirus de souche RRV, le virus produirait moins d'ARNm viraux, mais plus de protéines NSP3 en contre-partie (présence de NSP3 « libres »). Ceci aurait pour effet de ne pas inhiber aussi fortement la traduction poly(A), par contre les protéines NSP3 présentes en quantité importante empêcheraient l'export des ARNm poly(A) associés à la PABP par un mécanisme qui reste à déterminer notamment pour l'implication de RoXaN. Dans les deux cas, l'expression de NSP3 finirait par induire la relocalisation de la PABP vers le noyau.



#### **IV/ Rôle de la protéine NSP3 sur la traduction des ARN de rotavirus**

L'une des objections dans l'implication de NSP3 dans la traduction était que d'une part la réduction des quantités en protéine NSP3 par ARNi lors d'infection n'avait pas d'effet sur la synthèse des autres protéines virales. D'autre part, la réduction des quantités du facteur eIF4G n'inhibe pas non plus la traduction virale, conduisant à la conclusion que les liaisons à eIF4G et à l'ARN virale par NSP3 étaient deux fonctions indépendantes de NSP3 (Montero et al., 2006). Le système d'expression de NSP3 en cellules BSR-T7 et de transfection d'ARN rapporteurs que nous avons utilisé, nous a permis de tester le rôle de NSP3 et de ses différents domaines sur la traduction des ARN de rotavirus (Figure 47).

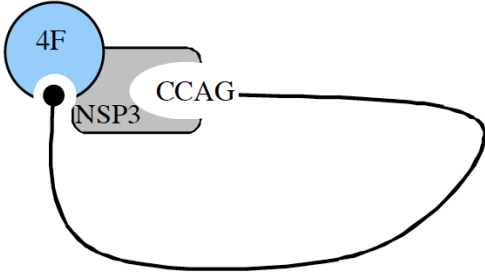
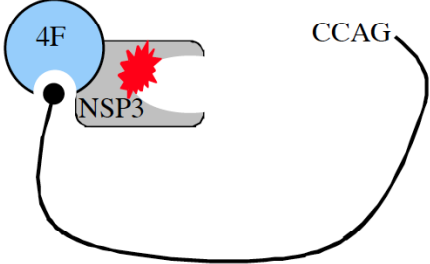
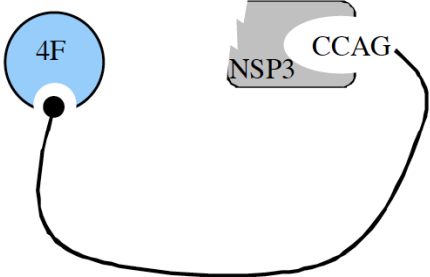
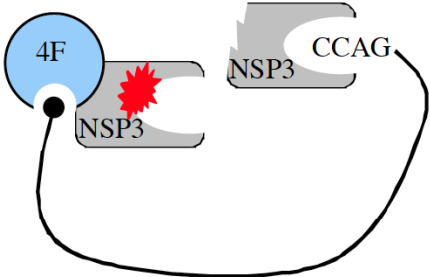
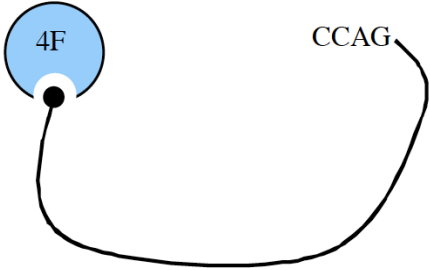
#### **A/ La traduction des ARN de rotavirus est dépendante de NSP3**

Ainsi, nous avons pu montrer qu'une faible quantité de NSP3 est nécessaire pour induire une stimulation de la traduction d'ARN rapporteurs Rota. Ces résultats ont été observés par expression transitoire ou stable de NSP3 : alors que les cellules C20bis expriment une quantité de protéines équivalente à celle détectée 2h après infection, une stimulation de la traduction des ARN rapporteur Rota de plus de 100 fois a été observée. De même, dans les cellules BSR-T7, une expression à peine détectable par immunodétection permet une stimulation de 10 fois de la traduction. Enfin, il faut noter que le même effet modéré de siRNA dirigés contre des facteurs de traduction a été noté auparavant comme, par exemple, le faible effet de la réduction d'eIF4G (Park et al., 2011b; Ramirez-Valle et al., 2008). Ainsi, l'utilisation du silençage par siRNA ne constitue donc pas une méthode d'étude idéale pour la caractérisation de la protéine NSP3 sur la traduction des ARNm viraux.

Le système en cellules BSR-T7 nous a enfin permis de montrer que la liaison à l'ARN est primordiale car la mutation du domaine correspondant (mutRBD) conduit à l'absence de stimulation de la traduction du rapporteur Rota (Figure 62). De plus, la suppression de la liaison à eIF4G (d4G) conduit à une diminution de la stimulation de la traduction de 2 à 3 fois environ comparée à la protéine NSP3 wt signifiant que le domaine de liaison à eIF4G a aussi son importance dans la traduction des ARN viraux (Figure 62). D'ailleurs, le fait de coexprimer les deux mutants mutRBD et d4G ne conduit pas à une stimulation accrue de la traduction des ARNm rapporteurs. Si les liaisons à eIF4G et à l'ARNm étaient dissociables lors de la traduction de l'ARN viral, il y aurait dû y avoir un certain niveau de compensation en coexprimant les deux mutants. De fait, aux vues de ces résultats, la traduction des ARNm de rotavirus passe bien par la liaison simultanée à l'ARN et à eIF4G (Figure 62).

**Figure 62 : Les domaines de liaison à l'ARN et à eIF4G de NSP3 sont tous les deux nécessaires à la traduction des ARNm de rotavirus.**

Représentations de l'effet des différentes constructions de NSP3 utilisées. Le pourcentage de stimulations des ARN rapporteurs correspondants est indiqué. Seule la présence de deux domaines fonctionnels sur NSP3 permet d'induire une traduction efficace de l'ARNm.

<u>Constructions</u>		<u>Niveaux de stimulation</u>
WT		100%
mutRBD		≈20%
d4G		≈40%
mutRBD + d4G		≈40%
Sans NSP3		≈10%



## **B/ Premiers cycles et initiation de la traduction dépendante de NSP3.**

L'un des objectifs lors de la caractérisation de NSP3 était de savoir comment s'opèrent les premiers cycles de traduction des ARN viraux sans NSP3.

Un système de traduction a donc été mis en place où des ARN rapporteurs Rota codant à la fois la luciférase Firefly et NSP3 sauvage ou mutées ont été transfectés dans des cellules BSR-T7 ou MA104 (Figure 51). Un effet des mutations dans les domaines de liaison à l'ARN (mutRBD) ou à eIF4G (d4G) a été retrouvé, soulignant l'importance de l'action conjointe entre ces deux domaines pour induire la traduction de l'ARN viral (Figure 51). Étonnamment, la mutation du domaine de liaison à l'ARN de NSP3 ne diminue pas autant la traduction que la suppression de l'extrémité 3' GACC (mutant Nona). Cela peut s'expliquer par le fait que le mutant de liaison à l'ARN n'est pas absolu et serait encore légèrement capable de lier l'ARN viral stimulant faiblement la traduction de celui-ci. De plus, les ARN transfectés sont très rapidement dégradés (en 10 minutes environ) ce qui limite fortement le niveau de stimulation de la traduction (Figure 52). Une autre possibilité serait que l'extrémité 3' aurait elle-même un effet lors de la traduction indépendamment de NSP3. Enfin, une dernière hypothèse serait que la luciférase Firefly n'est pas assez sensible pour mettre plus en évidence cette différence.

Cette dernière hypothèse est en accord avec la différence faible mais significative (facteur x2) observée entre la traduction en absence de NSP3 d'un ARN rapporteur se finissant par des cytosines et celle d'un rapporteur sans cytosine à l'extrémité 3' (Figure 55). Ainsi, la présence de cytosines à l'extrémité 3' GACC aiderait au maintien, et à une légère stimulation de la traduction des ARNm viraux lorsque NSP3 n'est pas présente. En dehors de ce phénomène de cytosines terminales (présentes sur tous les ARNm de rotavirus), nous n'avons pas pu identifier, au sein du gène 7 de rotavirus, de séquences ou de structures secondaires d'ARN permettant une traduction indépendante de NSP3. L'expression de NSP3 au début de l'infection se ferait donc par une « fuite » du système de traduction cellulaire, puis l'apport des premières molécules de NSP3 permettrait de stimuler fortement la synthèse des protéines virales. Néanmoins, on ne peut écarter le fait que la séquence codante de la luciférase Firefly et la séquence T2A pourraient avoir un impact par exemple sur la structure secondaire de l'ARN empêchant le fonctionnement d'un éventuel « enhancer » de traduction au sein du gène 7.

## **V/ Caractéristiques des ARN de rotavirus**

### **A/ Extrémités non canonique : NSP3 et virulence ?**

Des différences d'extrémités 3' ont été caractérisées dans certains gènes chez certaines souches de rotavirus avec notamment des extrémités GGCC et GAACC moins reconnues par la

protéine NSP3. Il n'avait cependant pas été déterminé si ces extrémités pouvaient être reconnues préférentiellement par la protéine NSP3 issue de la même souche que l'extrémité correspondante. Nous avons testé l'effet de protéines NSP3 issues de différentes souches sur leurs capacités à stimuler la traduction d'ARN Rota aux extrémités variables. Les résultats ont montré que, quelle que soit la souche d'origine de la protéine NSP3, la traduction des ARN rapporteurs n'ayant pas l'extrémité consensus GACC, n'est pas ou très peu stimulée (Figures 54 et 55).

Cette observation pose la question de l'utilité des protéines codées par des ARNm viraux avec des extrémités non conventionnelles. Notamment, le gène 7 codant NSP3 de rotavirus de souche SA11 possède une extrémité 3' se finissant par GGCC et devrait donc conduire à une production moindre en NSP3. Néanmoins, cela n'empêche pas le virus SA11 de se multiplier. De fait, on peut de nouveau supposer que peu de NSP3 serait nécessaire pour induire une traduction suffisante des autres protéines.

Du fait de la production moindre de NSP3 par le rotavirus de souche SA11, on peut aussi supposer que son impact sur l'inhibition de la traduction des ARNm cellulaires est aussi amoindri. Nous avons testé l'effet de l'infection de cellules MA104 par le rotavirus de souche SA11 sur la traduction d'ARN rapporteurs poly(A) et aucune réduction de la traduction de ces ARN en infection n'a été observée (Résultats préliminaires non présentés).

L'absence d'inhibition de la traduction cellulaire, cumulée au fait que la protéine NSP3 ne peut pas, ou pas aussi efficacement, stimuler sa propre synthèse, pourrait expliquer les résultats observés sur la capacité - variable d'un rotavirus à l'autre - à se propager en dehors de l'intestin chez les souris (Mossel and Ramig, 2002). Il a été montré que les virus réassortants issus de coinfection par les rotavirus de souche RRV et SA11, capables de se propager efficacement en dehors de l'intestin, possèdent majoritairement le gène 7 de souche RRV (Mossel and Ramig, 2002). L'une des différences entre les gènes 7 des souches RRV et SA11 est l'extrémité 3' qui se finit par GACC pour l'un et GGCC pour l'autre. Ainsi, les virus comportant un gène 7 avec une extrémité GACC seraient capables de se multiplier plus rapidement et d'inhiber la traduction cellulaire, empêchant l'induction de signaux antiviraux ; alors qu'avec une extrémité GGCC, le virus serait plus lent et mieux « contenu » par l'organisme. On ne peut exclure cependant l'impact de la protéine NSP3 même dont les séquences portent quelques différences entre les deux souches (81% d'identités entre gènes 7 de RRV et SA11).

## **B/ Influence des régions non codantes (UTR) sur la traduction des ARN de rotavirus**

### **1/ Effet de la région non codante en 5' (5' UTR)**

Du fait de la petite taille de son génome, le rotavirus possède des régions non codantes (UTR) de tailles particulièrement réduites. Il a été montré dans un système de traduction *in vitro* qu'en présence d'eIF1, l'initiation est d'autant plus réduite que les codons d'initiation sont proches de l'extrémité 5' (Pestova and Kolupaeva, 2002). Il est d'ailleurs estimé que la longueur entre le site P et la sortie du ribosome est d'environ 12nt (Ingolia et al., 2009) : en conséquence, avec des 5' UTR courtes, l'étape de balayage lors de l'initiation semble peu probable.

Nous nous sommes intéressés à la traduction d'ARN rapporteurs Rota comportant une 5' UTR de gène 4 (9nt) ou raccourcie. En outre, le contexte nucléotidique autour de l'AUG a été modifié afin de vérifier si la « loi » de Kozak s'applique toujours dans ce cas de figure.

Mes résultats ont permis de montrer que lorsque la traduction des ARN rapporteurs dépend de NSP3, le raccourcissement de l'extrémité 5' n'a qu'un effet limité sur l'efficacité de traduction, sauf dans le cas d'une extrémité réduite à 2nt avant le codon d'initiation (Figure 56A). Lorsque la traduction des ARN rapporteurs dépend de la PABP, le raccourcissement de l'extrémité 5' (9nt et 5nt) conduit à une légère baisse de la traduction. Par contre, comme pour une traduction dépendante de NSP3, un raccourcissement à 2nt conduit à une forte baisse de la traduction de l'ARN rapporteur (Figure 56B). Ainsi, le raccourcissement du 5' UTR en dessous de 12nt ne conduit pas nécessairement à une forte réduction de l'initiation de la traduction à partir du premier codon d'initiation.

Cela avait été observé par Pestova et Kolupeava (Pestova and Kolupaeva, 2002) avec un ARN rapporteur dont la 5' UTR longue de 8nt, pouvait conduire *in vitro* à une initiation de la traduction. Cependant, il pouvait être suggéré que la traduction « *in cellulo* » soit plus stringente que la traduction *in vitro*.

Seule la mutation des deux nucléotides permettant d'avoir un contexte défavorable autour de l'AUG conduit à une baisse de la traduction dépendante de NSP3 de l'ARN rapporteur (Figure 57). Si le contexte nucléotidique du codon d'initiation aide à une bonne traduction des ARN rapporteurs, son impact reste relativement minime même lorsque la 5' UTR précédant le codon d'initiation est raccourcie à 5 nucléotides et que le contexte nucléotidique est partiellement favorable. Dans les travaux de M.Kozak, les effets observés sur le gène de l'insuline étaient beaucoup plus marqués : un facteur 10 minimum pouvait être observé avec un A en position -3 ou un G en position +4. Et un facteur 25 était observé avec un A en position -3 et un G en position +4 simultanément (Kozak, 1986). Pour expliquer l'impact plus faible de l'environnement nucléotidique de l'AUG dans nos

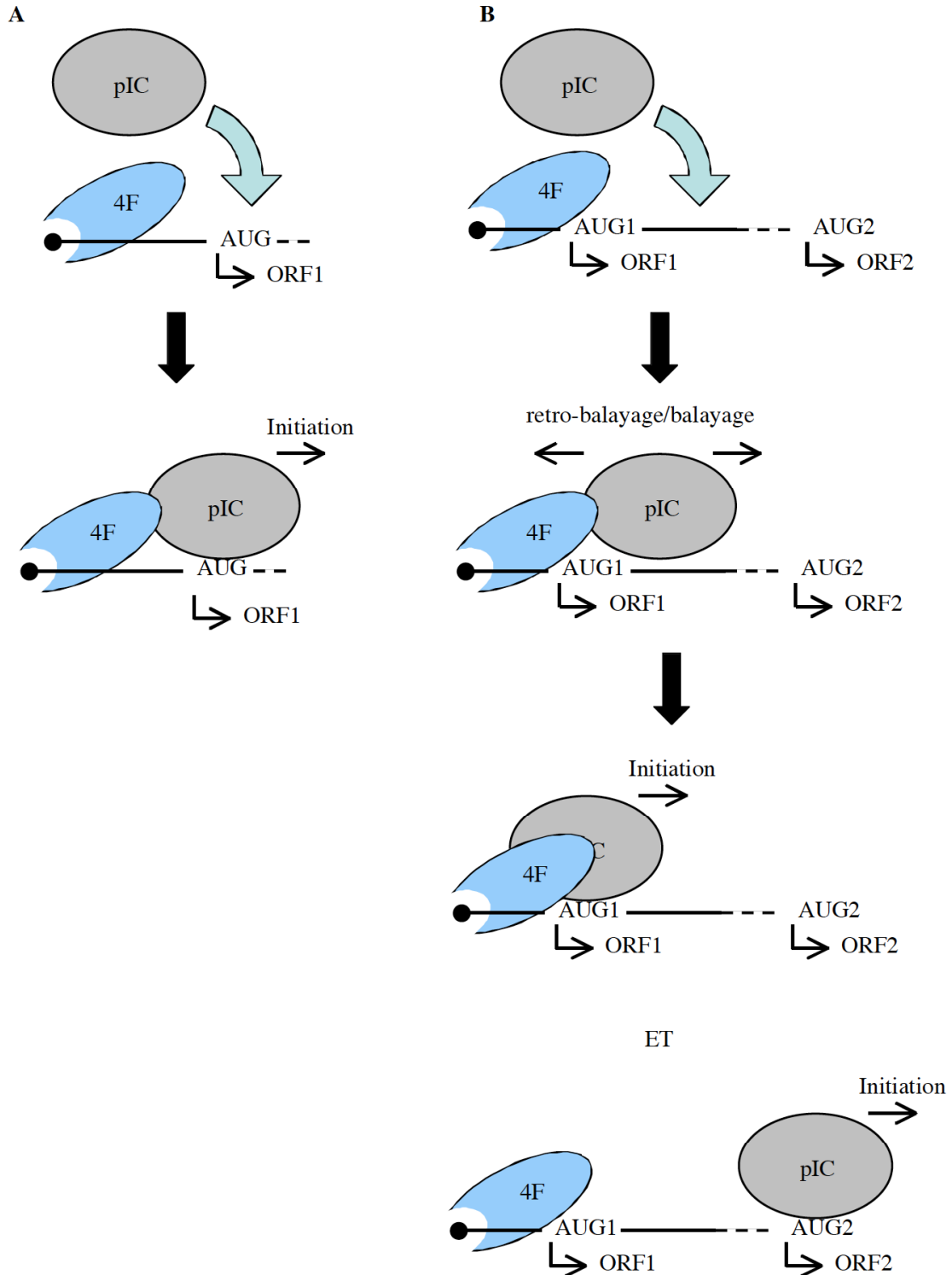
résultats, outre le gène rapporteur utilisé (luciférase vs insuline), l'étude n'est ni effectuée dans le même système ni sur la même durée : M.Kozak a effectué son étude en transfectant des plasmides mutés autour de l'AUG de l'insuline dans des cellules COS puis les a laissées incuber deux jours. Il n'est donc pas impossible que des écarts puissent être plus forts dans un tel système (Kozak, 1986).

Dans nos expériences, compte tenu de l'architecture du complexe d'initiation et la taille réduite du 5' UTR de gène 4, le PIC est soit directement fixé sur le codon d'initiation et présenterait une affinité de force variable pour l'AUG selon le contexte nucléotidique environnant (Figure 63). Ou alors le PIC est fixé après le codon d'initiation, puis est capable d'effectuer un « rétro-balayage » (phénomène de « backward excursion », (Matsuda and Dreher, 2006)) pour reconnaître le codon (Figure 63). Dans ce dernier cas, on peut facilement concevoir que, contrairement à ce qui a été observé, la traduction devrait être réduite puisqu'une fraction des ribosomes ne devrait pas être capable d'effectuer ce rétro-balayage. Dans tous les cas, l'ARN n'emprunterait pas la totalité du canal ARN lorsque la sous-unité 60S est recrutée.

Afin d'obtenir des conditions comparables entre cellules exprimant et cellules n'exprimant pas NSP3, ce sont des cellules BSR-T7 qui ont été utilisées dans nos expériences. Ces cellules sont cependant une lignée de cellules immortalisées : il n'est pas impossible que la traduction y soit régulée différemment. Il serait peut être intéressant de voir comment ces ARN rapporteurs, avec de courtes régions 5' UTR, sont traduits dans des cellules comme les MA104 ou la lignée C20bis. De plus, bien que cela ait été testé en partie, il serait intéressant de voir l'effet de ces différentes 5' UTR sur des ARN rapporteurs polyadénylés : cela permettrait de voir si les effets qui ont été observés sont exclusifs à une traduction dépendante de NSP3.

**Figure 63 : Modèles d'initiation de la traduction sur des ARN rapporteurs avec une 5' UTR courte.**

**(A)** Le complexe PIC est recruté et l'initiation s'effectue directement au niveau du codon d'initiation (phase codante la protéine fonctionnelle) le plus proximal de l'extrémité 5'. **(B)** Le complexe PIC est recruté en aval du codon d'initiation puis est capable d'effectuer des balayages et rétro-balayages lui permettant d'initier la traduction au niveau de l'AUG1 (synthèse d'une protéine fonctionnelle) ou de l'AUG2 (synthèse d'une protéine non-fonctionnelle).



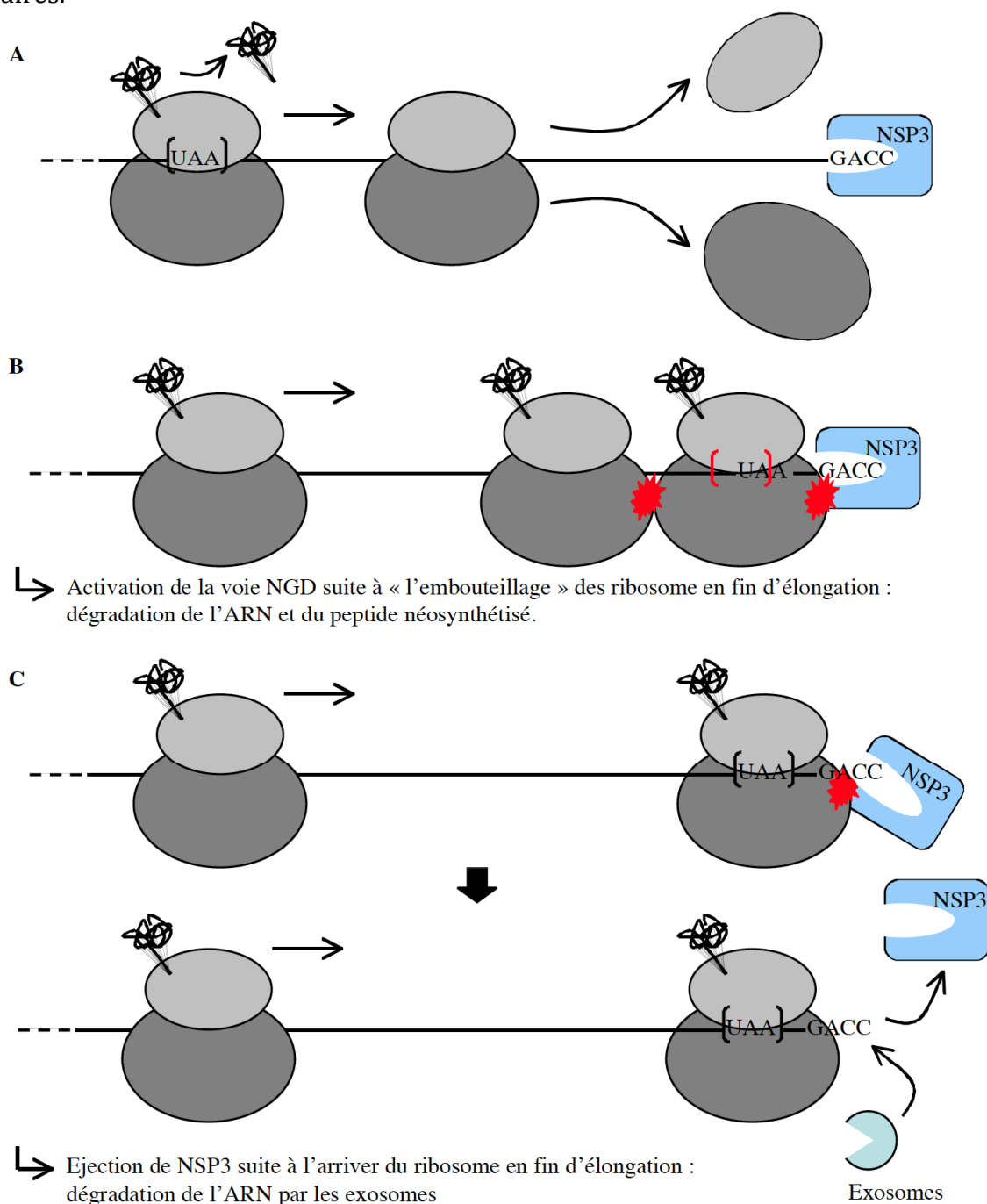
## 2/ Effet de la région non codante en 3' (3' UTR)

Pour étudier l'effet du 3' UTR sur la traduction d'ARN rapporteurs Rota, et l'effet de l'association de 5' et 3' UTR variables (Figures 58 et 59), différentes combinaisons, de 5' et 3' UTR plus ou moins courtes, ont été testées. Le raccourcissement du 3' UTR à 11nt conduit à une absence de la traduction de l'ARN rapporteur quelle que soit la longueur du 5' UTR en amont de la séquence codante. A l'inverse, nous avons pu aussi observer une augmentation de la traduction (comparée à l'ARN rapporteur de référence) lorsque la séquence du 3' UTR du gène 4 est randomisée.

L'accessibilité de la séquence GACC (estimée par prédiction de structures secondaires de l'ARN) reconnue par NSP3 et la longueur de la séquence en 3' permettent de comprendre les résultats obtenus (Figure 60). Ainsi, dans le cas de 3' UTR de 11nt, nous supposons que ces séquences trop courtes conduisent soit au blocage de la terminaison des ribosomes par encombrement stérique dû à la présence de NSP3 ; soit, à l'inverse, l'arrivée des ribosomes en 3' conduit au détachement de NSP3, rendant l'ARN rapporteur vulnérable à la dégradation en 3'-5' par les exosomes (Figure 64).

**Figure 64 : Modèle de terminaison de la traduction sur des ARNm comportant une 3' UTR courte.**

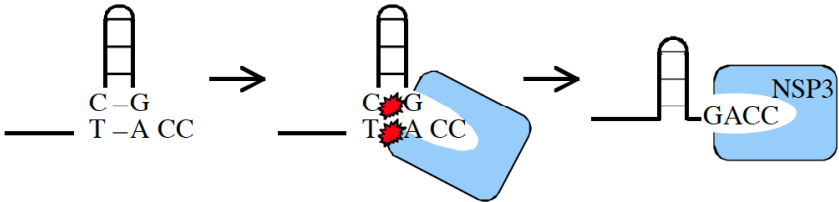
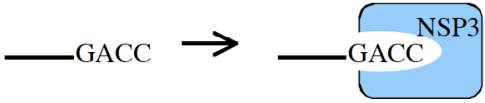
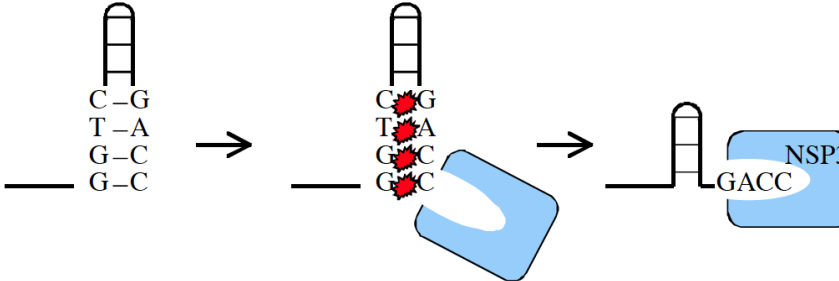
**(A)** Terminaison classique avec une 3' UTR de longueur suffisante : la reconnaissance du codon de terminaison permet la libération du peptide néosynthétisé puis la séparation des sous unités 40S et 60S du ribosome. **(B)** Premier modèle de terminaison à partir d'une 3' UTR courte (11 nucléotides) : la présence de NSP3 à l'extrémité 3' empêcherait la reconnaissance du codon de terminaison par un blocage des ribosomes en cours d'élongation. Ce blocage conduirait alors à l'activation de la voie NoGo Decay (NGD). **(C)** Second modèle de terminaison à partir d'une 3' UTR courte (11 nucléotides) : l'arrivée du ribosome à l'extrémité 3' éjecterait NSP3 de l'extrémité 3' GACC permettant la reconnaissance du codon de terminaison, mais rendant l'extrémité 3' libre accessible aux systèmes de dégradation cellulaires.



Concernant les autres rapporteurs dont le niveau de traduction est soit légèrement diminué, soit équivalent, soit supérieur à celui de l'ARN rapporteur de référence ; nous expliquons les niveaux d'activités par l'accessibilité de la séquence GACC. Ainsi, selon le degré de structure secondaire, la séquence GACC est plus ou moins accessible à NSP3, influant donc sur le niveau de traduction de l'ARN cible (Figure 65).

**Figure 65 : Niveau de traduction de l'ARNm selon l'accessibilité de l'extrémité 3' GACC pour NSP3.**

**(A)** L'extrémité 3' partiellement accessible pour NSP3 conduit à une stimulation correspondant au niveau de stimulation observé par l'ARN rapporteur de référence. **(B)** L'extrémité 3' complètement accessible correspond à l'ARNm rapporteur ayant une stimulation de la traduction plus forte que l'ARN rapporteur de référence. **(C)** L'extrémité 3' inaccessible pour NSP3 correspond à l'ARNm rapporteur ayant une stimulation de la traduction plus faible que l'ARN rapporteur de référence.

Modèles	Stimulation
<b>A</b> 	+
<b>B</b> 	++
<b>C</b> 	+-

Afin de confirmer ces données, la détermination de la structure secondaire réelle de ces ARN (maintenant possible par des approches haut débit (Kertesz et al., 2010)) serait utile et permettrait de créer d'autres ARN rapporteurs avec des séquences 3' GACC complètement accessibles ou à l'inverse complètement inaccessibles.



## VI/ Conclusions et perspectives

Différentes méthodes d'étude ont été mises en œuvre afin de comprendre les mécanismes de traduction lors d'une infection par le rotavirus. J'ai pu montrer que l'infection par le rotavirus stimulait l'expression des ARN de rotavirus. Par l'utilisation de cellules susceptibles aux rotavirus et exprimant la protéine NSP3 seule, j'ai montré que celle-ci est responsable de la stimulation de la traduction des ARNm viraux, comme cela avait été montré dans un système *in vitro* (Vende et al., 2000) et que la stabilisation des ARNm de rotavirus n'était vraisemblablement pas à l'origine de cette stimulation de la traduction.

De plus, j'ai pu montrer que le niveau d'inhibition de la traduction des ARNm cellulaires était dépendant de la souche de rotavirus utilisée lors de l'infection. Afin de vraiment déterminer si ce phénomène est dépendant de la protéine NSP3, des mono-réassortants, entre rotavirus de souche RF et RRV qui ne diffèrent que par l'origine du gène 7, pourront être étudiés. Il serait aussi intéressant de voir si des protéines NSP3 de souches différentes, dont la capacité à inhiber la traduction diffère, peuvent jouer un rôle sur la virulence du rotavirus. Par contre, je n'ai pas pu reproduire l'inhibition de la traduction des ARN poly(A) par l'expression de NSP3 seule. L'utilisation de mono-réassortants ou d'un système permettant une plus forte expression dans un plus grand nombre de cellules pourrait éventuellement permettre de savoir si NSP3 seule est capable de bloquer la traduction cellulaire.

J'ai mis au point un système me permettant d'étudier le rôle de NSP3 lors de la traduction *in vivo*. Ce système permet non seulement de tester des protéines NSP3 de différentes souches mais aussi de tester différents types d'ARN. L'une des applications possibles de ce système sera ensuite de coexprimer NSP3 avec d'autres protéines virales afin de détecter un effet stimulateur ou inhibiteur de la traduction par ces protéines virales : il a par exemple été montré *in vitro* que NSP1 inhibait la réduction de la traduction par NSP3 des ARN poly(A) (Chung and McCrae, 2011), ce phénomène pourrait éventuellement être vérifié *in vivo*. D'autres questions pourront aussi être abordées à l'aide de ce système : la fixation de la polymérase virale VP1 à l'extrémité 3' bloque-t-elle la traduction des ARNm viraux ? Les protéines NSP3 des autres groupes de rotavirus (B, C, D...H), malgré des différences importantes de séquences, présentent-elles les mêmes propriétés de stimulation de la traduction ?

Il a été montré que l'infection par le rotavirus conduit à la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (Montero et al., 2008). Il serait intéressant de voir si l'induction de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  ou l'expression de mutant constitutivement actif d'eIF2 $\alpha$ , dans notre système hors infection, affecte la traduction d'ARN rapporteurs Rota transfectés dans des cellules exprimant NSP3 et si des

caractéristiques particulières des ARN de rotavirus leur permettent d'être traduits dans ces conditions (taille, structures secondaires des 5' UTR par exemple).

Enfin, mon travail sur les régions 5' non codantes pose des questions concernant les mécanismes de reconnaissance du codon d'initiation par le PIC au cours de la traduction dépendante de NSP3. Des études supplémentaires avec des ARN comportant des UTR longues et structurées de gènes cellulaires seront nécessaires afin de mieux décrypter ces phénomènes. Enfin, outre l'importance pour la reconnaissance de l'extrémité 3' par NSP3, la séquence GACC semble avoir aussi un rôle dans la capacité de l'ARN à être traduit en absence de NSP3 ce qui favorise la synthèse des premières molécules de NSP3 au début du cycle viral.

L'impact des miRNA sur la traduction dépendante de NSP3 demande à être étudié. En effet, il a été montré récemment que la régulation de la traduction par les miRNA est dépendante de la présence de la PABP et que la présence d'une UTR structurée en 5' et le recrutement d'eIF2A est nécessaire à l'inhibition de la traduction par les miRNA (Meijer et al., 2013). Une traduction dépendante de NSP3 avec de courtes 5' UTR pourrait ainsi rendre la traduction des ARN de rotavirus insensibles aux miRNA. Ce travail, que j'ai abordé au cours de ma thèse (résultats non présentés), pourra être poursuivi à l'aide du système que j'ai mis au point.

## **Bibliographie**

### **A**

- Abaeva, I.S., Marintchev, A., Pisareva, V.P., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2011). Bypassing of stems versus linear base-by-base inspection of mammalian mRNAs during ribosomal scanning. *The EMBO journal* 30, 115-129.
- Acker, M.G., Shin, B.S., Dever, T.E., and Lorsch, J.R. (2006). Interaction between eukaryotic initiation factors 1A and 5B is required for efficient ribosomal subunit joining. *The Journal of biological chemistry* 281, 8469-8475.
- Acker, M.G., Shin, B.S., Nanda, J.S., Saini, A.K., Dever, T.E., and Lorsch, J.R. (2009). Kinetic analysis of late steps of eukaryotic translation initiation. *Journal of molecular biology* 385, 491-506.
- Acosta-Jaquez, H.A., Keller, J.A., Foster, K.G., Ekim, B., Soliman, G.A., Feener, E.P., Ballif, B.A., and Fingar, D.C. (2009). Site-specific mTOR phosphorylation promotes mTORC1-mediated signaling and cell growth. *Molecular and cellular biology* 29, 4308-4324.
- Afonina, E., Stauber, R., and Pavlakis, G.N. (1998). The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *The Journal of biological chemistry* 273, 13015-13021.
- Afrikanova, I., Fabbretti, E., Miozzo, M.C., and Burrone, O.R. (1998). Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. *The Journal of general virology* 79 ( Pt 11), 2679-2686.
- Alam, M.M., Kobayashi, N., Ishino, M., Nagashima, S., Paul, S.K., Chawla-Sarkar, M., Krishnan, T., and Naik, T.N. (2008). Identical rearrangement of NSP3 genes found in three independently isolated virus clones derived from mixed infection and multiple passages of Rotaviruses. *Archives of virology* 153, 555-559.
- Algire, M.A., Maag, D., and Lorsch, J.R. (2005). Pi release from eIF2, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation. *Molecular cell* 20, 251-262.
- Ali, I.K., McKendrick, L., Morley, S.J., and Jackson, R.J. (2001). Activity of the hepatitis A virus IRES requires association between the cap-binding translation initiation factor (eIF4E) and eIF4G. *Journal of virology* 75, 7854-7863.
- Alkalaeva, E.Z., Pisarev, A.V., Frolova, L.Y., Kisselev, L.L., and Pestova, T.V. (2006). In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell* 125, 1125-1136.
- Alvarez, E., Castello, A., Menendez-Arias, L., and Carrasco, L. (2006). HIV protease cleaves poly(A)-binding protein. *The Biochemical journal* 396, 219-226.
- Alvarez, E., Menendez-Arias, L., and Carrasco, L. (2003). The eukaryotic translation initiation factor 4GI is cleaved by different retroviral proteases. *Journal of virology* 77, 12392-12400.
- Aoki, S.T., Settembre, E.C., Trask, S.D., Greenberg, H.B., Harrison, S.C., and Dormitzer, P.R. (2009). Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. *Science (New York, NY)* 324, 1444-1447.
- Aoyagi, M., Gaspar, M., and Shenk, T.E. (2010). Human cytomegalovirus UL69 protein facilitates translation by associating with the mRNA cap-binding complex and excluding 4EBP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 2640-2645.
- Aponte, C., Poncet, D., and Cohen, J. (1996). Recovery and characterization of a replicase complex in rotavirus-infected cells by using a monoclonal antibody against NSP2. *Journal of virology* 70, 985-991.
- Arnold, M.M., Brownback, C.S., Taraporewala, Z.F., and Patton, J.T. (2012). Rotavirus variant replicates efficiently although encoding an aberrant NSP3 that fails to induce nuclear localization of poly(A)-binding protein. *The Journal of general virology* 93, 1483-1494.
- Arnoldi, F., De Lorenzo, G., Mano, M., Schraner, E.M., Wild, P., Eichwald, C., and Burrone, O.R. (2014). Rotavirus increases levels of lipidated LC3 supporting accumulation of infectious progeny virus without inducing autophagosome formation. *PloS one* 9, e95197.
- Arslan, D., Legendre, M., Seltzer, V., Abergel, C., and Claverie, J.M. (2011). Distant Mimivirus relative with a larger genome highlights the fundamental features of Megaviridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 17486-17491.
- Asano, K., Clayton, J., Shalev, A., and Hinnebusch, A.G. (2000). A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes & development* 14, 2534-2546.
- Asano, K., Shalev, A., Phan, L., Nielsen, K., Clayton, J., Valasek, L., Donahue, T.F., and Hinnebusch, A.G. (2001). Multiple roles for the C-terminal domain of eIF5 in translation initiation complex assembly and GTPase activation. *The EMBO journal* 20, 2326-2337.
- Au, K.S., Chan, W.K., Burns, J.W., and Estes, M.K. (1989). Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *Journal of virology* 63, 4553-4562.
- Ayala-Breton, C., Arias, M., Espinosa, R., Romero, P., Arias, C.F., and Lopez, S. (2009). Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference. *Journal of virology* 83, 8819-8831.

## B

- Babaylova, E., Graifer, D., Malygin, A., Stahl, J., Shatsky, I., and Karpova, G. (2009). Positioning of subdomain IIIId and apical loop of domain II of the hepatitis C IRES on the human 40S ribosome. *Nucleic acids research* 37, 1141-1151.
- Babiuk, L.A., Mohammed, K., Spence, L., Fauvel, M., and Petro, R. (1977). Rotavirus isolation and cultivation in the presence of trypsin. *Journal of clinical microbiology* 6, 610-617.
- Baker, T.S., Olson, N.H., and Fuller, S.D. (1999). Adding the third dimension to virus life cycles: three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 862-922, table of contents.
- Ball, J.M., Mitchell, D.M., Gibbons, T.F., and Parr, R.D. (2005). Rotavirus NSP4: a multifunctional viral enterotoxin. *Viral immunology* 18, 27-40.
- Banerjee, P., Ahmad, M.F., Grove, J.R., Kozlosky, C., Price, D.J., and Avruch, J. (1990). Molecular structure of a major insulin/mitogen-activated 70-kDa S6 protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 8550-8554.
- Baron, C.H. (2008). Rôle de la protéine NSP3 dans la traduction de son propre ARN messager et sur la synthèse des autres protéines virales  
Université Paris XI, Faculté de pharmacie de Chatenay-Malabry  
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué.
- Barreau, C., Dutertre, S., Paillard, L., and Osborne, H.B. (2006). Liposome-mediated RNA transfection should be used with caution. *RNA (New York, NY)* 12, 1790-1793.
- Barro, M., and Patton, J.T. (2005). Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 4114-4119.
- Barro, M., and Patton, J.T. (2007). Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7. *Journal of virology* 81, 4473-4481.
- Bellinzoni, R.C., Mattion, N.M., Burrone, O., Gonzalez, A., La Torre, J.L., and Scodeller, E.A. (1987). Isolation of group A swine rotaviruses displaying atypical electropherotypes. *Journal of clinical microbiology* 25, 952-954.
- Berois, M., Sapin, C., Erk, I., Poncet, D., and Cohen, J. (2003). Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *Journal of virology* 77, 1757-1763.
- Berry, K.E., Waghray, S., and Doudna, J.A. (2010). The HCV IRES pseudoknot positions the initiation codon on the 40S ribosomal subunit. *RNA (New York, NY)* 16, 1559-1569.
- Berthelot, K., Muldoon, M., Rajkowsch, L., Hughes, J., and McCarthy, J.E. (2004). Dynamics and processivity of 40S ribosome scanning on mRNA in yeast. *Molecular microbiology* 51, 987-1001.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology* 2, 326-332.
- Bhowmick, R., Halder, U.C., Chattopadhyay, S., Nayak, M.K., and Chawla-Sarkar, M. (2013). Rotavirus-encoded nonstructural protein 1 modulates cellular apoptotic machinery by targeting tumor suppressor protein p53. *Journal of virology* 87, 6840-6850.
- Bican, P., Cohen, J., Charpilienne, A., and Scherrer, R. (1982). Purification and characterization of bovine rotavirus cores. *Journal of virology* 43, 1113-1117.
- Bieniossek, C., Schutz, P., Bumann, M., Limacher, A., Uson, I., and Baumann, U. (2006). The crystal structure of the carboxy-terminal domain of human translation initiation factor eIF5. *Journal of molecular biology* 360, 457-465.
- Bierle, C.J., Semmens, K.M., and Geballe, A.P. (2013). Double-stranded RNA binding by the human cytomegalovirus PKR antagonist TRS1. *Virology* 442, 28-37.
- Bilgin, D.D., Liu, Y., Schiff, M., and Dinesh-Kumar, S.P. (2003). P58(IPK), a plant ortholog of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR inhibitor, functions in viral pathogenesis. *Developmental cell* 4, 651-661.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7, 1513-1523.
- Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H., and Ruck, B.J. (1973). Letter: Evidence for viral gastroenteritis. *The New England journal of medicine* 289, 1096-1097.
- Bonderoff, J.M., Larey, J.L., and Lloyd, R.E. (2008). Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C proteinase inhibits viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Journal of virology* 82, 9389-9399.
- Borman, A.M., Michel, Y.M., and Kean, K.M. (2001). Detailed analysis of the requirements of hepatitis A virus internal ribosome entry segment for the eukaryotic initiation factor complex eIF4F. *Journal of virology* 75, 7864-7871.
- Both, G.W., Bellamy, A.R., and Siegman, L.J. (1984). Nucleotide sequence of the dsRNA genomic segment 7 of Simian 11 rotavirus. *Nucleic acids research* 12, 1621-1626.
- Boyle, J.F., and Holmes, K.V. (1986). RNA-binding proteins of bovine rotavirus. *Journal of virology* 58, 561-568.
- Bradrick, S.S., Dobrikova, E.Y., Kaiser, C., Shveygert, M., and Gromeier, M. (2007). Poly(A)-binding protein is differentially required for translation mediated by viral internal ribosome entry sites. *RNA (New York, NY)* 13, 1582-1593.

Braun, I.C., Herold, A., Rode, M., Conti, E., and Izaurralde, E. (2001). Overexpression of TAP/p15 heterodimers bypasses nuclear retention and stimulates nuclear mRNA export. *The Journal of biological chemistry* 276, 20536-20543.

Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Schaller, H., Khafif, M., Schott, G., Bendahmane, A., and Voinnet, O. (2012). Isoprenoid biosynthesis is required for miRNA function and affects membrane association of ARGONAUTE 1 in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 1778-1783.

Broquet, A.H., Hirata, Y., McAllister, C.S., and Kagnoff, M.F. (2010). RIG-I/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus-infected intestinal epithelium. *J Immunol* 186, 1618-1626.

Brunet, J.P., Cotte-Laffitte, J., Linxe, C., Quero, A.M., Geniteau-Legendre, M., and Servin, A. (2000). Rotavirus infection induces an increase in intracellular calcium concentration in human intestinal epithelial cells: role in microvillar actin alteration. *Journal of virology* 74, 2323-2332.

Buchholz, U.J., Finke, S., and Conzelmann, K.K. (1999). Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *Journal of virology* 73, 251-259.

Buchkovich, N.J., Yu, Y., Zampieri, C.A., and Alwine, J.C. (2008). The TORrid affairs of viruses: effects of mammalian DNA viruses on the PI3K-Akt-mTOR signalling pathway. *Nature reviews* 6, 266-275.

Burgess, H.M., Richardson, W.A., Anderson, R.C., Salaun, C., Graham, S.V., and Gray, N.K. (2011). Nuclear relocalisation of cytoplasmic poly(A)-binding proteins PABP1 and PABP4 in response to UV irradiation reveals mRNA-dependent export of metazoan PABPs. *Journal of cell science* 124, 3344-3355.

Burgui, I., Yanguéz, E., Sonenberg, N., and Nieto, A. (2007). Influenza virus mRNA translation revisited: is the eIF4E cap-binding factor required for viral mRNA translation? *Journal of virology* 81, 12427-12438.

Burns, J.W., Greenberg, H.B., Shaw, R.D., and Estes, M.K. (1988). Functional and topographical analyses of epitopes on the hemagglutinin (VP4) of the simian rotavirus SA11. *Journal of virology* 62, 2164-2172.

Burns, J.W., Siadat-Pajouh, M., Krishnaney, A.A., and Greenberg, H.B. (1996). Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science (New York, NY)* 272, 104-107.

Burysek, L., and Pitha, P.M. (2001). Latently expressed human herpesvirus 8-encoded interferon regulatory factor 2 inhibits double-stranded RNA-activated protein kinase. *Journal of virology* 75, 2345-2352.

Buttgereit, F., and Brand, M.D. (1995). A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *The Biochemical journal* 312 ( Pt 1), 163-167.

Buxade, M., Parra-Palau, J.L., and Proud, C.G. (2008). The Mnk: MAP kinase-interacting kinases (MAP kinase signal-integrating kinases). *Front Biosci* 13, 5359-5373.

Byrd, M.P., Zamora, M., and Lloyd, R.E. (2005). Translation of eukaryotic translation initiation factor 4GI (eIF4GI) proceeds from multiple mRNAs containing a novel cap-dependent internal ribosome entry site (IRES) that is active during poliovirus infection. *The Journal of biological chemistry* 280, 18610-18622.

## C

Cacoullos, N., and Bablanian, R. (1991). Polyadenylated RNA sequences produced in vaccinia virus-infected cells under aberrant conditions inhibit protein synthesis in vitro. *Virology* 184, 747-751.

Campagna, M., Budini, M., Arnoldi, F., Desselberger, U., Allende, J.E., and Burrone, O.R. (2007). Impaired hyperphosphorylation of rotavirus NSP5 in cells depleted of casein kinase 1alpha is associated with the formation of viroplasms with altered morphology and a moderate decrease in virus replication. *The Journal of general virology* 88, 2800-2810.

Campagna, M., Eichwald, C., Vascotto, F., and Burrone, O.R. (2005). RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *The Journal of general virology* 86, 1481-1487.

Cao, D., Barro, M., and Hoshino, Y. (2008). Porcine rotavirus bearing an aberrant gene stemming from an intergenic recombination of the NSP2 and NSP5 genes is defective and interfering. *Journal of virology* 82, 6073-6077.

Caron, E., Ghosh, S., Matsuoka, Y., Ashton-Beaucage, D., Therrien, M., Lemieux, S., Perreault, C., Roux, P.P., and Kitano, H. (2010). A comprehensive map of the mTOR signaling network. *Molecular systems biology* 6, 453.

Carper, S.W., Rocheleau, T.A., Cimino, D., and Storm, F.K. (1997). Heat shock protein 27 stimulates recovery of RNA and protein synthesis following a heat shock. *Journal of cellular biochemistry* 66, 153-164.

Carpick, B.W., Graziano, V., Schneider, D., Maitra, R.K., Lee, X., and Williams, B.R. (1997). Characterization of the solution complex between the interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase and HIV-I trans-activating region RNA. *The Journal of biological chemistry* 272, 9510-9516.

Caruthers, J.M., Johnson, E.R., and McKay, D.B. (2000). Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13080-13085.

Castello, A., Quintas, A., Sanchez, E.G., Sabina, P., Nogal, M., Carrasco, L., and Revilla, Y. (2009). Regulation of host translational machinery by African swine fever virus. *PLoS pathogens* 5, e1000562.

Cevallos, R.C., and Sarnow, P. (2005). Factor-independent assembly of elongation-competent ribosomes by an internal ribosome entry site located in an RNA virus that infects penaeid shrimp. *Journal of virology* 79, 677-683.

Chang, H.W., Watson, J.C., and Jacobs, B.L. (1992). The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 4825-4829.

Charpilienne, A., Abad, M.J., Michelangeli, F., Alvarado, F., Vasseur, M., Cohen, J., and Ruiz, M.C. (1997). Solubilized and cleaved VP7, the outer glycoprotein of rotavirus, induces permeabilization of cell membrane vesicles. *The Journal of general virology* 78 ( Pt 6), 1367-1371.

Charpilienne, A., Lepault, J., Rey, F., and Cohen, J. (2002). Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity. *Journal of virology* 76, 7822-7831.

Charpilienne, A., Nejmeddine, M., Berois, M., Perez, N., Neumann, E., Hewat, E., Trugnan, G., and Cohen, J. (2001). Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells. *The Journal of biological chemistry* 276, 29361-29367.

Chavatte, L., Seit-Nebi, A., Dubovaya, V., and Favre, A. (2002). The invariant uridine of stop codons contacts the conserved NIKSR loop of human eRF1 in the ribosome. *The EMBO journal* 21, 5302-5311.

Chemello, M.E., Aristimuno, O.C., Michelangeli, F., and Ruiz, M.C. (2002). Requirement for vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activity and Ca<sup>2+</sup> gradient during entry of rotavirus into MA104 cells. *Journal of virology* 76, 13083-13087.

Chen, D., Barros, M., Spencer, E., and Patton, J.T. (2001). Features of the 3'-consensus sequence of rotavirus mRNAs critical to minus strand synthesis. *Virology* 282, 221-229.

Chen, D., Burns, J.W., Estes, M.K., and Ramig, R.F. (1989). Phenotypes of rotavirus reassortants depend upon the recipient genetic background. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 3743-3747.

Chen, D., Luongo, C.L., Nibert, M.L., and Patton, J.T. (1999). Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase. *Virology* 265, 120-130.

Chen, D., and Patton, J.T. (1998). Rotavirus RNA replication requires a single-stranded 3' end for efficient minus-strand synthesis. *Journal of virology* 72, 7387-7396.

Chen, D., and Patton, J.T. (2000). De novo synthesis of minus strand RNA by the rotavirus RNA polymerase in a cell-free system involves a novel mechanism of initiation. *RNA (New York, NY)* 6, 1455-1467.

Chen, D., Zeng, C.Q., Wentz, M.J., Gorziglia, M., Estes, M.K., and Ramig, R.F. (1994). Template-dependent, in vitro replication of rotavirus RNA. *Journal of virology* 68, 7030-7039.

Cheng, Z., Saito, K., Pisarev, A.V., Wada, M., Pisareva, V.P., Pestova, T.V., Gajda, M., Round, A., Kong, C., Lim, M., *et al.* (2009). Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1. *Genes & development* 23, 1106-1118.

Cheung, Y.N., Maag, D., Mitchell, S.F., Fekete, C.A., Algire, M.A., Takacs, J.E., Shirokikh, N., Pestova, T., Lorsch, J.R., and Hinnebusch, A.G. (2007). Dissociation of eIF1 from the 40S ribosomal subunit is a key step in start codon selection in vivo. *Genes & development* 21, 1217-1230.

Chnaiderman, J., Barro, M., and Spencer, E. (2002). NSP5 phosphorylation regulates the fate of viral mRNA in rotavirus infected cells. *Archives of virology* 147, 1899-1911.

Chnaiderman, J., Diaz, J., Magnusson, G., Liprandi, F., and Spencer, E. (1998). Characterization of a rotavirus rearranged gene 11 by gene reassortment. *Archives of virology* 143, 1711-1722.

Chuluunbaatar, U., Roller, R., Feldman, M.E., Brown, S., Shokat, K.M., and Mohr, I. (2010). Constitutive mTORC1 activation by a herpesvirus Akt surrogate stimulates mRNA translation and viral replication. *Genes & development* 24, 2627-2639.

Chung, K.T., and McCrae, M.A. (2011). Regulation of gene expression by the NSP1 and NSP3 non-structural proteins of rotavirus. *Archives of virology* 156, 2197-2203.

Ciarlet, M., Ludert, J.E., Iturriza-Gomara, M., Liprandi, F., Gray, J.J., Desselberger, U., and Estes, M.K. (2002). Initial interaction of rotavirus strains with N-acetylneuraminic (sialic) acid residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin. *Journal of virology* 76, 4087-4095.

Clark, S.M., Roth, J.R., Clark, M.L., Barnett, B.B., and Spendlove, R.S. (1981). Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. *Journal of virology* 39, 816-822.

Cohen, J., Charpilienne, A., Chilmonczyk, S., and Estes, M.K. (1989). Nucleotide sequence of bovine rotavirus gene 1 and expression of the gene product in baculovirus. *Virology* 171, 131-140.

Cohen, J., Garbarg-Chenon, A., and Pothier, P. (2002). Les gastroentérites virales

Cohen, J., Laporte, J., Charpilienne, A., and Scherrer, R. (1979). Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Archives of virology* 60, 177-186.

Coldwell, M.J., Sack, U., Cowan, J.L., Barrett, R.M., Vlasak, M., Sivakumaran, K., and Morley, S.J. (2012). Multiple isoforms of the translation initiation factor eIF4GII are generated via use of alternative promoters, splice sites and a non-canonical initiation codon. *The Biochemical journal* 448, 1-11.

Colina, R., Costa-Mattioli, M., Dowling, R.J., Jaramillo, M., Tai, L.H., Breitbach, C.J., Martineau, Y., Larsson, O., Rong, L., Svitkin, Y.V., *et al.* (2008). Translational control of the innate immune response through IRF-7. *Nature* 452, 323-328.

Connor, J.H., and Lyles, D.S. (2002). Vesicular stomatitis virus infection alters the eIF4F translation initiation complex and causes dephosphorylation of the eIF4E binding protein 4E-BP1. *Journal of virology* 76, 10177-10187.

- Conte, M.R., Kelly, G., Babon, J., Sanfelice, D., Youell, J., Smerdon, S.J., and Proud, C.G. (2006). Structure of the eukaryotic initiation factor (eIF) 5 reveals a fold common to several translation factors. *Biochemistry* 45, 4550-4558.
- Contin, R., Arnoldi, F., Campagna, M., and Burrone, O.R. (2010). Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins. *The Journal of general virology* 91, 1782-1793.
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N.K., and Linder, P. (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367, 17-37.
- Corthesy, B., Benureau, Y., Perrier, C., Fourgeux, C., Parez, N., Greenberg, H., and Schwartz-Cornil, I. (2006). Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes to protection via intracellular neutralization but not via immune exclusion. *Journal of virology* 80, 10692-10699.
- Cosson, B., Berkova, N., Couturier, A., Chabelskaya, S., Philippe, M., and Zhouravleva, G. (2002). Poly(A)-binding protein and eRF3 are associated in vivo in human and *Xenopus* cells. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 94, 205-216.
- Coulson, B.S. (1987). Variation in neutralization epitopes of human rotaviruses in relation to genomic RNA polymorphism. *Virology* 159, 209-216.
- Crawford, S.E., Hyser, J.M., Utama, B., and Estes, M.K. (2012). Autophagy hijacked through viroporin-activated calcium/calmodulin-dependent kinase-beta signaling is required for rotavirus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E3405-3413.
- Crawford, S.E., Labbe, M., Cohen, J., Burroughs, M.H., Zhou, Y.J., and Estes, M.K. (1994). Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *Journal of virology* 68, 5945-5952.
- Credle, J.J., Finer-Moore, J.S., Papa, F.R., Stroud, R.M., and Walter, P. (2005). On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 18773-18784.
- Criglar, J.M., Hu, L., Crawford, S.E., Hyser, J.M., Broughman, J.R., Prasad, B.V., and Estes, M.K. (2013). A novel form of rotavirus NSP2 and phosphorylation-dependent NSP2-NSP5 interactions are associated with viroplasm assembly. *Journal of virology*.
- Cuadras, M.A., Bordier, B.B., Zambrano, J.L., Ludert, J.E., and Greenberg, H.B. (2006). Dissecting rotavirus particle-raft interaction with small interfering RNAs: insights into rotavirus transit through the secretory pathway. *Journal of virology* 80, 3935-3946.
- Cuesta, R., Laroia, G., and Schneider, R.J. (2000a). Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes & development* 14, 1460-1470.
- Cuesta, R., Xi, Q., and Schneider, R.J. (2000b). Adenovirus-specific translation by displacement of kinase Mnk1 from cap-initiation complex eIF4F. *The EMBO journal* 19, 3465-3474.
- Cuesta, R., Xi, Q., and Schneider, R.J. (2004). Structural basis for competitive inhibition of eIF4G-Mnk1 interaction by the adenovirus 100-kilodalton protein. *Journal of virology* 78, 7707-7716.

## D

- Daughenbaugh, K.F., Fraser, C.S., Hershey, J.W., and Hardy, M.E. (2003). The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *The EMBO journal* 22, 2852-2859.
- Daughenbaugh, K.F., Wobus, C.E., and Hardy, M.E. (2006). VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Virology journal* 3, 33.
- Davies, M.V., Chang, H.W., Jacobs, B.L., and Kaufman, R.J. (1993). The E3L and K3L vaccinia virus gene products stimulate translation through inhibition of the double-stranded RNA-dependent protein kinase by different mechanisms. *Journal of virology* 67, 1688-1692.
- De Benedetti, A., and Graff, J.R. (2004). eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* 23, 3189-3199.
- de Breyne, S., Soto-Rifo, R., Lopez-Lastra, M., and Ohlmann, T. (2013). Translation initiation is driven by different mechanisms on the HIV-1 and HIV-2 genomic RNAs. *Virus research* 171, 366-381.
- de Breyne, S., Yu, Y., Pestova, T.V., and Hellen, C.U. (2008). Factor requirements for translation initiation on the Simian picornavirus internal ribosomal entry site. *RNA (New York, NY)* 14, 367-380.
- de Breyne, S., Yu, Y., Unbehaun, A., Pestova, T.V., and Hellen, C.U. (2009). Direct functional interaction of initiation factor eIF4G with type 1 internal ribosomal entry sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 9197-9202.
- Dector, M.A., Romero, P., Lopez, S., and Arias, C.F. (2002). Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO reports* 3, 1175-1180.
- Delmas, O., Breton, M., Sapin, C., Le Bivic, A., Colard, O., and Trugnan, G. (2007). Heterogeneity of Raft-type membrane microdomains associated with VP4, the rotavirus spike protein, in Caco-2 and MA 104 cells. *Journal of virology* 81, 1610-1618.

- Delmas, O., Gardet, A., Chwetzoff, S., Breton, M., Cohen, J., Colard, O., Sapin, C., and Trugnan, G. (2004). Different ways to reach the top of a cell. Analysis of rotavirus assembly and targeting in human intestinal cells reveals an original raft-dependent, Golgi-independent apical targeting pathway. *Virology* 327, 157-161.
- Deo, R.C., Bonanno, J.B., Sonenberg, N., and Burley, S.K. (1999). Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* 98, 835-845.
- Deo, R.C., Groft, C.M., Rajashankar, K.R., and Burley, S.K. (2002). Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer. *Cell* 108, 71-81.
- Desselberger, U., and McCrae, M.A. (1994). The rotavirus genome. *Current topics in microbiology and immunology* 185, 31-66.
- Dev, K., Qiu, H., Dong, J., Zhang, F., Barthlme, D., and Hinnebusch, A.G. (2010). The beta/Gcd7 subunit of eukaryotic translation initiation factor 2B (eIF2B), a guanine nucleotide exchange factor, is crucial for binding eIF2 in vivo. *Molecular and cellular biology* 30, 5218-5233.
- Dias, A., Bouvier, D., Crepin, T., McCarthy, A.A., Hart, D.J., Baudin, F., Cusack, S., and Ruigrok, R.W. (2009). The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* 458, 914-918.
- Dmitriev, S.E., Terenin, I.M., Andreev, D.E., Ivanov, P.A., Dunaevsky, J.E., Merrick, W.C., and Shatsky, I.N. (2010). GTP-independent tRNA delivery to the ribosomal P-site by a novel eukaryotic translation factor. *The Journal of biological chemistry* 285, 26779-26787.
- Donahue, T.F. (2000). Genetic Approaches to Translation Initiation in *Saccharomyces cerevisiae* de N. Sonenberg, J.W.B. Hershey, M.B. Mathews *Translational Control of Gene Expression* 39, 487-502.
- Donahue, T.F., and Cigan, A.M. (1988). Genetic selection for mutations that reduce or abolish ribosomal recognition of the HIS4 translational initiator region. *Molecular and cellular biology* 8, 2955-2963.
- Dong, J., Qiu, H., Garcia-Barrio, M., Anderson, J., and Hinnebusch, A.G. (2000). Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Molecular cell* 6, 269-279.
- Dormitzer, P.R., and Greenberg, H.B. (1992). Calcium chelation induces a conformational change in recombinant herpes simplex virus-1-expressed rotavirus VP7. *Virology* 189, 828-832.
- Dormitzer, P.R., Greenberg, H.B., and Harrison, S.C. (2000). Purified recombinant rotavirus VP7 forms soluble, calcium-dependent trimers. *Virology* 277, 420-428.
- Dormitzer, P.R., Nason, E.B., Prasad, B.V., and Harrison, S.C. (2004). Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature* 430, 1053-1058.
- Dormitzer, P.R., Sun, Z.Y., Wagner, G., and Harrison, S.C. (2002). The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *The EMBO journal* 21, 885-897.
- Dorrello, N.V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N.H., Sherman, N.E., and Pagano, M. (2006). S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science (New York, NY)* 314, 467-471.
- Dowling, R.J., Topisirovic, I., Alain, T., Bidinosti, M., Fonseca, B.D., Petroulakis, E., Wang, X., Larsson, O., Selvaraj, A., Liu, Y., *et al.* (2010). mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science (New York, NY)* 328, 1172-1176.
- Dunn, E.F., and Connor, J.H. (2011). Dominant inhibition of Akt/protein kinase B signaling by the matrix protein of a negative-strand RNA virus. *Journal of virology* 85, 422-431.
- Dunn, S.J., Cross, T.L., and Greenberg, H.B. (1994). Comparison of the rotavirus nonstructural protein NSP1 (NS53) from different species by sequence analysis and northern blot hybridization. *Virology* 203, 178-183.
- Dutta, D., Chattopadhyay, S., Bagchi, P., Halder, U.C., Nandi, S., Mukherjee, A., Kobayashi, N., Taniguchi, K., and Chawla-Sarkar, M. (2011). Active participation of cellular chaperone Hsp90 in regulating the function of rotavirus nonstructural protein 3 (NSP3). *The Journal of biological chemistry* 286, 20065-20077.

## E

- Eichwald, C., Arnoldi, F., Laimbacher, A.S., Schraner, E.M., Fraefel, C., Wild, P., Burrone, O.R., and Ackermann, M. (2012). Rotavirus viroplasm fusion and perinuclear localization are dynamic processes requiring stabilized microtubules. *PloS one* 7, e47947.
- Ekim, B., Magnuson, B., Acosta-Jaquez, H.A., Keller, J.A., Feener, E.P., and Fingar, D.C. (2011). mTOR kinase domain phosphorylation promotes mTORC1 signaling, cell growth, and cell cycle progression. *Molecular and cellular biology* 31, 2787-2801.
- Elaid, S., Libersou, S., Ouldali, M., Morellet, N., Desbat, B., Alves, I.D., Lepault, J., and Bouaziz, S. (2014). A peptide derived from the rotavirus outer capsid protein VP7 permeabilizes artificial membranes. *Biochimica et biophysica acta* 1838, 2026-2035.
- Ellison, K.S., Maranchuk, R.A., Mottet, K.L., and Smiley, J.R. (2005). Control of VP16 translation by the herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP27. *Journal of virology* 79, 4120-4131.
- Erk, I., Huet, J.C., Duarte, M., Duquerroy, S., Rey, F., Cohen, J., and Lepault, J. (2003). A zinc ion controls assembly and stability of the major capsid protein of rotavirus. *Journal of virology* 77, 3595-3601.



Escoffre, J.M., Portet, T., Wasungu, L., Teissie, J., Dean, D., and Rols, M.P. (2009). What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues. *Molecular biotechnology* 41, 286-295.

Eskelin, K., Hafren, A., Rantalainen, K.I., and Makinen, K. (2011). Potyviral VPg enhances viral RNA Translation and inhibits reporter mRNA translation in planta. *Journal of virology* 85, 9210-9221.

Estes, M.K., and Cohen, J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiological reviews* 53, 410-449.

Estes, M.K., and Graham, D.Y. (1985). Rotavirus antigens. *Advances in experimental medicine and biology* 185, 201-214.

Estes, M.K., Graham, D.Y., and Mason, B.B. (1981). Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *Journal of virology* 39, 879-888.

Estes, M.K., and Kapikian, A.Z. (2007). Rotaviruses and their replication. *Fields Virology*, 5th edn.

Eyler, D.E., and Green, R. (2011). Distinct response of yeast ribosomes to a miscoding event during translation. *RNA* (New York, NY) 17, 925-932.

## F

Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F., and Burrone, O.R. (1999). Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *The Journal of general virology* 80 ( Pt 2), 333-339.

Fabian, M.R., Mathonnet, G., Sundermeier, T., Mathys, H., Zipprich, J.T., Svitkin, Y.V., Rivas, F., Jinek, M., Wohlschlegel, J., Doudna, J.A., *et al.* (2009). Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Molecular cell* 35, 868-880.

Farruggio, D., Chaudhuri, J., Maitra, U., and RajBhandary, U.L. (1996). The A1 x U72 base pair conserved in eukaryotic initiator tRNAs is important specifically for binding to the eukaryotic translation initiation factor eIF2. *Molecular and cellular biology* 16, 4248-4256.

Feigenblum, D., and Schneider, R.J. (1993). Modification of eukaryotic initiation factor 4F during infection by influenza virus. *Journal of virology* 67, 3027-3035.

Feng, N., Lawton, J.A., Gilbert, J., Kuklin, N., Vo, P., Prasad, B.V., and Greenberg, H.B. (2002). Inhibition of rotavirus replication by a non-neutralizing, rotavirus VP6-specific IgA mAb. *The Journal of clinical investigation* 109, 1203-1213.

Fenton, T.R., and Gout, I.T. (2011). Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *The international journal of biochemistry & cell biology* 43, 47-59.

Feoktistova, K., Tuvshintogs, E., Do, A., and Fraser, C.S. (2013). Human eIF4E promotes mRNA restructuring by stimulating eIF4A helicase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 13339-13344.

Fiore, L., Greenberg, H.B., and Mackow, E.R. (1991). The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology* 181, 553-563.

Fischer, M.G., Allen, M.J., Wilson, W.H., and Suttle, C.A. (2010). Giant virus with a remarkable complement of genes infects marine zooplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 19508-19513.

Flores, J., Sears, J., Green, K.Y., Perez-Schael, I., Morantes, A., Daoud, G., Gorziglia, M., Hoshino, Y., Chanock, R.M., and Kapikian, A.Z. (1988). Genetic stability of rotaviruses recovered from asymptomatic neonatal infections. *Journal of virology* 62, 4778-4781.

Fontaine-Rodriguez, E.C., and Knipe, D.M. (2008). Herpes simplex virus ICP27 increases translation of a subset of viral late mRNAs. *Journal of virology* 82, 3538-3545.

Foster, K.G., Acosta-Jaquez, H.A., Romeo, Y., Ekim, B., Soliman, G.A., Carriere, A., Roux, P.P., Ballif, B.A., and Fingar, D.C. (2010). Regulation of mTOR complex 1 (mTORC1) by raptor Ser863 and multisite phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 285, 80-94.

Fraser, C.S., and Doudna, J.A. (2007). Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nature reviews* 5, 29-38.

Fringer, J.M., Acker, M.G., Fekete, C.A., Lorsch, J.R., and Dever, T.E. (2007). Coupled release of eukaryotic translation initiation factors 5B and 1A from 80S ribosomes following subunit joining. *Molecular and cellular biology* 27, 2384-2397.

Frolova, L., Le Goff, X., Zhouravleva, G., Davydova, E., Philippe, M., and Kisselev, L. (1996). Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase. *RNA* (New York, NY) 2, 334-341.

Fujimura, T., and Esteban, R. (2011). Cap-snatching mechanism in yeast L-A double-stranded RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 17667-17671.

Fukunaga, R., and Hunter, T. (1997). MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *The EMBO journal* 16, 1921-1933.

Furic, L., Rong, L., Larsson, O., Koumakpayi, I.H., Yoshida, K., Brueschke, A., Petroulakis, E., Robichaud, N., Pollak, M., Gaboury, L.A., *et al.* (2010). eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 14134-14139.

## G

- Gajardo, R., Vende, P., Poncet, D., and Cohen, J. (1997). Two proline residues are essential in the calcium-binding activity of rotavirus VP7 outer capsid protein. *Journal of virology* *71*, 2211-2216.
- Gale, M., Jr., Blakely, C.M., Kwieciszewski, B., Tan, S.L., Dossett, M., Tang, N.M., Korth, M.J., Polyak, S.J., Gretch, D.R., and Katze, M.G. (1998). Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Molecular and cellular biology* *18*, 5208-5218.
- Gale, M., Jr., and Foy, E.M. (2005). Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* *436*, 939-945.
- Gallegos, C.O., and Patton, J.T. (1989). Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology* *172*, 616-627.
- Gallie, D.R. (2001). Cap-independent translation conferred by the 5' leader of tobacco etch virus is eukaryotic initiation factor 4G dependent. *Journal of virology* *75*, 12141-12152.
- Garbarg-Chenon, A., Bricout, F., and Nicolas, J.C. (1984). Study of genetic reassortment between two human rotaviruses. *Virology* *139*, 358-365.
- Gardet, A., Breton, M., Fontanges, P., Trugnan, G., and Chwetzoff, S. (2006). Rotavirus spike protein VP4 binds to and remodels actin bundles of the epithelial brush border into actin bodies. *Journal of virology* *80*, 3947-3956.
- Gardet, A., Breton, M., Trugnan, G., and Chwetzoff, S. (2007). Role for actin in the polarized release of rotavirus. *Journal of virology* *81*, 4892-4894.
- Gault, E. (1998). *Génétique des rotavirus*. 2.
- Gault, E., Schnepf, N., Poncet, D., Servant, A., Teran, S., and Garbarg-Chenon, A. (2001). A human rotavirus with rearranged genes 7 and 11 encodes a modified NSP3 protein and suggests an additional mechanism for gene rearrangement. *Journal of virology* *75*, 7305-7314.
- Gingras, A.C., Gygi, S.P., Raught, B., Polakiewicz, R.D., Abraham, R.T., Hoekstra, M.F., Aebersold, R., and Sonenberg, N. (1999). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes & development* *13*, 1422-1437.
- Gingras, A.C., Raught, B., Gygi, S.P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S.K., Polakiewicz, R.D., Wyslouch-Cieszyńska, A., Aebersold, R., and Sonenberg, N. (2001). Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes & development* *15*, 2852-2864.
- Gingras, A.C., and Sonenberg, N. (1997). Adenovirus infection inactivates the translational inhibitors 4E-BP1 and 4E-BP2. *Virology* *237*, 182-186.
- Gingras, A.C., Svitkin, Y., Belsham, G.J., Pause, A., and Sonenberg, N. (1996). Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 5578-5583.
- Goke, A., Goke, R., Knolle, A., Trusheim, H., Schmidt, H., Wilmen, A., Carmody, R., Goke, B., and Chen, Y.H. (2002). DUG is a novel homologue of translation initiation factor 4G that binds eIF4A. *Biochemical and biophysical research communications* *297*, 78-82.
- Gombold, J.L., Estes, M.K., and Ramig, R.F. (1985). Assignment of simian rotavirus SA11 temperature-sensitive mutant groups B and E to genome segments. *Virology* *143*, 309-320.
- Gombold, J.L., and Ramig, R.F. (1986). Analysis of reassortment of genome segments in mice mixedly infected with rotaviruses SA11 and RRV. *Journal of virology* *57*, 110-116.
- Gombold, J.L., and Ramig, R.F. (1987). Assignment of simian rotavirus SA11 temperature-sensitive mutant groups A, C, F, and G to genome segments. *Virology* *161*, 463-473.
- Gonzalez, R.A., Espinosa, R., Romero, P., Lopez, S., and Arias, C.F. (2000). Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Archives of virology* *145*, 1963-1973.
- Gonzalez, R.A., Torres-Vega, M.A., Lopez, S., and Arias, C.F. (1998). In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Archives of virology* *143*, 981-996.
- Gonzalez, S.A., Mattion, N.M., Bellinzoni, R., and Burrone, O.R. (1989). Structure of rearranged genome segment 11 in two different rotavirus strains generated by a similar mechanism. *The Journal of general virology* *70* ( Pt 6), 1329-1336.
- Goodfellow, I., Chaudhry, Y., Gioldasi, I., Gerondopoulos, A., Natoni, A., Labrie, L., Laliberte, J.F., and Roberts, L. (2005). Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO reports* *6*, 968-972.
- Goodman, A.G., Fornek, J.L., Medigeshi, G.R., Perrone, L.A., Peng, X., Dyer, M.D., Proll, S.C., Knoblaugh, S.E., Carter, V.S., Korth, M.J., *et al.* (2009). P58(IPK): a novel "CIHD" member of the host innate defense response against pathogenic virus infection. *PLoS pathogens* *5*, e1000438.

Goodman, A.G., Smith, J.A., Balachandran, S., Perwitasari, O., Proll, S.C., Thomas, M.J., Korth, M.J., Barber, G.N., Schiff, L.A., and Katze, M.G. (2007). The cellular protein P58IPK regulates influenza virus mRNA translation and replication through a PKR-mediated mechanism. *Journal of virology* 81, 2221-2230.

Gradi, A., Svitkin, Y.V., Imataka, H., and Sonenberg, N. (1998). Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11089-11094.

Graff, J.W., Ettayebi, K., and Hardy, M.E. (2009). Rotavirus NSP1 inhibits NFkappaB activation by inducing proteasome-dependent degradation of beta-TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism. *PLoS pathogens* 5, e1000280.

Graff, J.W., Ewen, J., Ettayebi, K., and Hardy, M.E. (2007). Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability. *The Journal of general virology* 88, 613-620.

Graham, A., Kudesia, G., Allen, A.M., and Desselberger, U. (1987). Reassortment of human rotavirus possessing genome rearrangements with bovine rotavirus: evidence for host cell selection. *The Journal of general virology* 68 ( Pt 1), 115-122.

Graham, K.L., Halasz, P., Tan, Y., Hewish, M.J., Takada, Y., Mackow, E.R., Robinson, M.K., and Coulson, B.S. (2003). Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry. *Journal of virology* 77, 9969-9978.

Graham, K.L., Takada, Y., and Coulson, B.S. (2006). Rotavirus spike protein VP5\* binds alpha2beta1 integrin on the cell surface and competes with virus for cell binding and infectivity. *The Journal of general virology* 87, 1275-1283.

Gray, N.K., Collier, J.M., Dickson, K.S., and Wickens, M. (2000). Multiple portions of poly(A)-binding protein stimulate translation in vivo. *The EMBO journal* 19, 4723-4733.

Green, S.R., and Mathews, M.B. (1992). Two RNA-binding motifs in the double-stranded RNA-activated protein kinase, DAI. *Genes & development* 6, 2478-2490.

Greenbaum, D., Luscombe, N.M., Jansen, R., Qian, J., and Gerstein, M. (2001). Interrelating different types of genomic data, from proteome to secretome: 'oming in on function. *Genome research* 11, 1463-1468.

Groft, C.M., and Burley, S.K. (2002). Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Molecular cell* 9, 1273-1283.

Gross, J.D., Moerke, N.J., von der Haar, T., Lugovskoy, A.A., Sachs, A.B., McCarthy, J.E., and Wagner, G. (2003). Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* 115, 739-750.

Gunnery, S., Rice, A.P., Robertson, H.D., and Mathews, M.B. (1990). Tat-responsive region RNA of human immunodeficiency virus 1 can prevent activation of the double-stranded-RNA-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 8687-8691.

## H

Harb, M., Becker, M.M., Vitour, D., Baron, C.H., Vende, P., Brown, S.C., Bolte, S., Arold, S.T., and Poncet, D. (2008). Nuclear localization of cytoplasmic poly(A)-binding protein upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN. *Journal of virology* 82, 11283-11293.

Haselhorst, T., Fleming, F.E., Dyason, J.C., Hartnell, R.D., Yu, X., Holloway, G., Santegoets, K., Kiefel, M.J., Blanchard, H., Coulson, B.S., *et al.* (2009). Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nature chemical biology* 5, 91-93.

Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development* 18, 1926-1945.

He, B., Gross, M., and Roizman, B. (1997). The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 843-848.

Hellen, C.U. (2009). IRES-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry. *Biochimica et biophysica acta* 1789, 558-570.

Henke, J.L., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schuttler, C.G., Fehr, C., Junemann, C., and Niepmann, M. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *The EMBO journal* 27, 3300-3310.

Hewish, M.J., Takada, Y., and Coulson, B.S. (2000). Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *Journal of virology* 74, 228-236.

Hilbert, M., Kebbel, F., Gubaev, A., and Klostermeier, D. (2011). eIF4G stimulates the activity of the DEAD box protein eIF4A by a conformational guidance mechanism. *Nucleic acids research* 39, 2260-2270.

Hinnebusch, A.G. (2011). Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 434-467, first page of table of contents.

Hinnebusch, A.G., Dever, T.E., and Asano, K. (2007). Mechanism of Translation Initiation in the Yeast *Saccharomyces*. *Translational Control in Biology and Medicine* de Mathwes MB, Sonenberg N, Hershey JWB, 225-268.

Holz, M.K., Ballif, B.A., Gygi, S.P., and Blenis, J. (2005). mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* 123, 569-580.

Hoshino, S., Imai, M., Kobayashi, T., Uchida, N., and Katada, T. (1999). The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-Poly(A) tail of mRNA. Direct association of eRF3/GSPT with polyadenylate-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 274, 16677-16680.

Hoshino, Y., Sereno, M.M., Midthun, K., Flores, J., Kapikian, A.Z., and Chanock, R.M. (1985). Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 8701-8704.

Hu, L., Crawford, S.E., Czako, R., Cortes-Penfield, N.W., Smith, D.F., Le Pendu, J., Estes, M.K., and Prasad, B.V. (2012). Cell attachment protein VP8\* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature* 485, 256-259.

Hua, J., Chen, X., and Patton, J.T. (1994). Deletion mapping of the rotavirus metalloprotein NS53 (NSP1): the conserved cysteine-rich region is essential for virus-specific RNA binding. *Journal of virology* 68, 3990-4000.

Huang, C., Lokugamage, K.G., Rozovics, J.M., Narayanan, K., Semler, B.L., and Makino, S. (2011). SARS coronavirus nsp1 protein induces template-dependent endonucleolytic cleavage of mRNAs: viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage. *PLoS pathogens* 7, e1002433.

Huang, J.T., and Schneider, R.J. (1991). Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis involves inactivation of cap-binding protein. *Cell* 65, 271-280.

Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 16961-16966.

Hundley, F., Biryahwaho, B., Gow, M., and Desselberger, U. (1985). Genome rearrangements of bovine rotavirus after serial passage at high multiplicity of infection. *Virology* 143, 88-103.

Hundley, F., McIntyre, M., Clark, B., Beards, G., Wood, D., Chrystie, I., and Desselberger, U. (1987). Heterogeneity of genome rearrangements in rotaviruses isolated from a chronically infected immunodeficient child. *Journal of virology* 61, 3365-3372.

## I

Ilkow, C.S., Mancinelli, V., Beatch, M.D., and Hobman, T.C. (2008). Rubella virus capsid protein interacts with poly(a)-binding protein and inhibits translation. *Journal of virology* 82, 4284-4294.

Imai, M., Akatani, K., Ikegami, N., and Furuichi, Y. (1983). Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. *Journal of virology* 47, 125-136.

Imataka, H., Gradi, A., and Sonenberg, N. (1998). A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *The EMBO journal* 17, 7480-7489.

Imataka, H., Olsen, H.S., and Sonenberg, N. (1997). A new translational regulator with homology to eukaryotic translation initiation factor 4G. *The EMBO journal* 16, 817-825.

Ingolia, N.T., Ghaemmaghami, S., Newman, J.R., and Weissman, J.S. (2009). Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science (New York, NY)* 324, 218-223.

Isa, P., Arias, C.F., and Lopez, S. (2006). Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconjugate journal* 23, 27-37.

Ivanov, P.V., Gehring, N.H., Kunz, J.B., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2008). Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *The EMBO journal* 27, 736-747.

## J

Jack, K., Bellodi, C., Landry, D.M., Niederer, R.O., Meskauskas, A., Musalgaonkar, S., Kopmar, N., Krasnykh, O., Dean, A.M., Thompson, S.R., *et al.* (2011). rRNA pseudouridylation defects affect ribosomal ligand binding and translational fidelity from yeast to human cells. *Molecular cell* 44, 660-666.

Jackson, R.J., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews* 11, 113-127.

Jan, E., and Sarnow, P. (2002). Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. *Journal of molecular biology* 324, 889-902.

Jang, S.K., Krausslich, H.G., Nicklin, M.J., Duke, G.M., Palmenberg, A.C., and Wimmer, E. (1988). A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *Journal of virology* 62, 2636-2643.

Jangra, R.K., Yi, M., and Lemon, S.M. (2010). Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *Journal of virology* 84, 6615-6625.

Jayaram, H., Estes, M.K., and Prasad, B.V. (2004). Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus research* 101, 67-81.

Jayaram, H., Taraporewala, Z., Patton, J.T., and Prasad, B.V. (2002). Rotavirus protein involved in genome replication and packaging exhibits a HIT-like fold. *Nature* *417*, 311-315.

Jennings, M.D., and Pavitt, G.D. (2010). eIF5 has GDI activity necessary for translational control by eIF2 phosphorylation. *Nature* *465*, 378-381.

Jopling, C.L., Schutz, S., and Sarnow, P. (2008). Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell host & microbe* *4*, 77-85.

Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., and Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science (New York, NY)* *309*, 1577-1581.

Jourdan, N., Maurice, M., Delautier, D., Quero, A.M., Servin, A.L., and Trugnan, G. (1997). Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *Journal of virology* *71*, 8268-8278.

## K

Kafasla, P., Morgner, N., Robinson, C.V., and Jackson, R.J. (2010). Polypyrimidine tract-binding protein stimulates the poliovirus IRES by modulating eIF4G binding. *The EMBO journal* *29*, 3710-3722.

Kamitani, W., Huang, C., Narayanan, K., Lokugamage, K.G., and Makino, S. (2009). A two-pronged strategy to suppress host protein synthesis by SARS coronavirus Nsp1 protein. *Nature structural & molecular biology* *16*, 1134-1140.

Kamitani, W., Narayanan, K., Huang, C., Lokugamage, K., Ikegami, T., Ito, N., Kubo, H., and Makino, S. (2006). Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 protein suppresses host gene expression by promoting host mRNA degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 12885-12890.

Kamoshita, N., Nomoto, A., and RajBhandary, U.L. (2009). Translation initiation from the ribosomal A site or the P site, dependent on the conformation of RNA pseudoknot I in dicistrovirus RNAs. *Molecular cell* *35*, 181-190.

Kapp, L.D., and Lorsch, J.R. (2004). GTP-dependent recognition of the methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2. *Journal of molecular biology* *335*, 923-936.

Kaspar, R.L., Rychlik, W., White, M.W., Rhoads, R.E., and Morris, D.R. (1990). Simultaneous cytoplasmic redistribution of ribosomal protein L32 mRNA and phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E after mitogenic stimulation of Swiss 3T3 cells. *The Journal of biological chemistry* *265*, 3619-3622.

Kazemi, S., Papadopolou, S., Li, S., Su, Q., Wang, S., Yoshimura, A., Matlaszewski, G., Dever, T.E., and Koromilas, A.E. (2004). Control of alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 alpha) phosphorylation by the human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein: implications for eIF2 alpha-dependent gene expression and cell death. *Molecular and cellular biology* *24*, 3415-3429.

Kearney, K., Chen, D., Taraporewala, Z.F., Vende, P., Hoshino, Y., Tortorici, M.A., Barro, M., and Patton, J.T. (2004). Cell-line-induced mutation of the rotavirus genome alters expression of an IRF3-interacting protein. *The EMBO journal* *23*, 4072-4081.

Kempf, B.J., and Barton, D.J. (2008). Poliovirus 2A(Pro) increases viral mRNA and polysome stability coordinately in time with cleavage of eIF4G. *Journal of virology* *82*, 5847-5859.

Kertesz, M., Wan, Y., Mazor, E., Rinn, J.L., Nutter, R.C., Chang, H.Y., and Segal, E. (2010). Genome-wide measurement of RNA secondary structure in yeast. *Nature* *467*, 103-107.

Khan, M.A., Miyoshi, H., Gallie, D.R., and Goss, D.J. (2008). Potyvirus genome-linked protein, VPg, directly affects wheat germ in vitro translation: interactions with translation initiation factors eIF4F and eIFiso4F. *The Journal of biological chemistry* *283*, 1340-1349.

Khoshnevis, S., Gross, T., Rotte, C., Baierlein, C., Ficner, R., and Krebber, H. (2010). The iron-sulphur protein RNase L inhibitor functions in translation termination. *EMBO reports* *11*, 214-219.

Kim, J.H., Park, S.M., Park, J.H., Keum, S.J., and Jang, S.K. (2011). eIF2A mediates translation of hepatitis C viral mRNA under stress conditions. *The EMBO journal* *30*, 2454-2464.

Knauf, U., Tschopp, C., and Gram, H. (2001). Negative regulation of protein translation by mitogen-activated protein kinase-interacting kinases 1 and 2. *Molecular and cellular biology* *21*, 5500-5511.

Kojima, K., Taniguchi, K., Kawagishi-Kobayashi, M., Matsuno, S., and Urasawa, S. (2000). Rearrangement generated in double genes, NSP1 and NSP3, of viable progenies from a human rotavirus strain. *Virus research* *67*, 163-171.

Kojima, K., Taniguchi, K., and Kobayashi, N. (1996a). Species-specific and interspecies relatedness of NSP1 sequences in human, porcine, bovine, feline, and equine rotavirus strains. *Archives of virology* *141*, 1-12.

Kojima, K., Taniguchi, K., Urasawa, T., and Urasawa, S. (1996b). Sequence analysis of normal and rearranged NSP5 genes from human rotavirus strains isolated in nature: implications for the occurrence of the rearrangement at the step of plus strand synthesis. *Virology* *224*, 446-452.

Kolupaeva, V.G., Hellen, C.U., and Shatsky, I.N. (1996). Structural analysis of the interaction of the pyrimidine tract-binding protein with the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and foot-and-mouth disease virus RNAs. *RNA (New York, NY)* *2*, 1199-1212.

Kolupaeva, V.G., Pestova, T.V., Hellen, C.U., and Shatsky, I.N. (1998). Translation eukaryotic initiation factor 4G recognizes a specific structural element within the internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus RNA. *The Journal of biological chemistry* 273, 18599-18604.

Komarova, A.V., Real, E., Borman, A.M., Brocard, M., England, P., Tordo, N., Hershey, J.W., Kean, K.M., and Jacob, Y. (2007). Rabies virus matrix protein interplay with eIF3, new insights into rabies virus pathogenesis. *Nucleic acids research* 35, 1522-1532.

Kononenko, A.V., Mitkevich, V.A., Dubovaya, V.I., Kolosov, P.M., Makarov, A.A., and Kisselev, L.L. (2008). Role of the individual domains of translation termination factor eRF1 in GTP binding to eRF3. *Proteins* 70, 388-393.

Korneeva, N.L., Lamphear, B.J., Hennigan, F.L., and Rhoads, R.E. (2000). Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 3 and eIF4A to human eIF4G-1. *The Journal of biological chemistry* 275, 41369-41376.

Koromilas, A.E., Lazaris-Karatzas, A., and Sonenberg, N. (1992). mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *The EMBO journal* 11, 4153-4158.

Kozak, M. (1984). Selection of initiation sites by eucaryotic ribosomes: effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequence for preproinsulin. *Nucleic acids research* 12, 3873-3893.

Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44, 283-292.

Kozak, M. (1989). Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Molecular and cellular biology* 9, 5073-5080.

Kozma, S.C., Ferrari, S., Bassand, P., Siegmann, M., Totty, N., and Thomas, G. (1990). Cloning of the mitogen-activated S6 kinase from rat liver reveals an enzyme of the second messenger subfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 7365-7369.

Kraschnefski, M.J., Bugarcic, A., Fleming, F.E., Yu, X., von Itzstein, M., Coulson, B.S., and Blanchard, H. (2009). Effects on sialic acid recognition of amino acid mutations in the carbohydrate-binding cleft of the rotavirus spike protein. *Glycobiology* 19, 194-200.

Krausslich, H.G., Nicklin, M.J., Toyoda, H., Etchison, D., and Wimmer, E. (1987). Poliovirus proteinase 2A induces cleavage of eucaryotic initiation factor 4F polypeptide p220. *Journal of virology* 61, 2711-2718.

Krishnamoorthy, T., Pavitt, G.D., Zhang, F., Dever, T.E., and Hinnebusch, A.G. (2001). Tight binding of the phosphorylated alpha subunit of initiation factor 2 (eIF2alpha) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation. *Molecular and cellular biology* 21, 5018-5030.

Kudchodkar, S.B., Yu, Y., Maguire, T.G., and Alwine, J.C. (2004). Human cytomegalovirus infection induces rapamycin-insensitive phosphorylation of downstream effectors of mTOR kinase. *Journal of virology* 78, 11030-11039.

Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E.P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (1998). Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Experimental cell research* 242, 540-547.

Kuhn, U., and Wahle, E. (2004). Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1678, 67-84.

Kumar, G.R., and Glaunsinger, B.A. (2010). Nuclear import of cytoplasmic poly(A) binding protein restricts gene expression via hyperadenylation and nuclear retention of mRNA. *Molecular and cellular biology* 30, 4996-5008.

Kumar, M., Jayaram, H., Vasquez-Del Carpio, R., Jiang, X., Taraporewala, Z.F., Jacobson, R.H., Patton, J.T., and Prasad, B.V. (2007). Crystallographic and biochemical analysis of rotavirus NSP2 with nucleotides reveals a nucleoside diphosphate kinase-like activity. *Journal of virology* 81, 12272-12284.

Kuyumcu-Martinez, M., Belliot, G., Sosnovtsev, S.V., Chang, K.O., Green, K.Y., and Lloyd, R.E. (2004). Calicivirus 3C-like proteinase inhibits cellular translation by cleavage of poly(A)-binding protein. *Journal of virology* 78, 8172-8182.

## L

Labbe, M., Baudoux, P., Charpilienne, A., Poncet, D., and Cohen, J. (1994). Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein. *The Journal of general virology* 75 ( Pt 12), 3423-3430.

Labbe, M., Charpilienne, A., Crawford, S.E., Estes, M.K., and Cohen, J. (1991). Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *Journal of virology* 65, 2946-2952.

Lachance, P.E., Miron, M., Raught, B., Sonenberg, N., and Lasko, P. (2002). Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4E is critical for growth. *Molecular and cellular biology* 22, 1656-1663.

Lai, M.C., Lee, Y.H., and Tarn, W.Y. (2008). The DEAD-box RNA helicase DDX3 associates with export messenger ribonucleoproteins as well as tip-associated protein and participates in translational control. *Molecular biology of the cell* 19, 3847-3858.

Lancaster, A.M., Jan, E., and Sarnow, P. (2006). Initiation factor-independent translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *RNA (New York, NY)* 12, 894-902.

Landry, D.M., Hertz, M.I., and Thompson, S.R. (2009). RPS25 is essential for translation initiation by the Dicistroviridae and hepatitis C viral IRESs. *Genes & development* 23, 2753-2764.

Langland, J.O., Pettiford, S., Jiang, B., and Jacobs, B.L. (1994). Products of the porcine group C rotavirus NSP3 gene bind specifically to double-stranded RNA and inhibit activation of the interferon-induced protein kinase PKR. *Journal of virology* 68, 3821-3829.

Larralde, O., Smith, R.W., Wilkie, G.S., Malik, P., Gray, N.K., and Clements, J.B. (2006). Direct stimulation of translation by the multifunctional herpesvirus ICP27 protein. *Journal of virology* 80, 1588-1591.

Lee, D.Y., and Sugden, B. (2008). The LMP1 oncogene of EBV activates PERK and the unfolded protein response to drive its own synthesis. *Blood* 111, 2280-2289.

LeFebvre, A.K., Korneeva, N.L., Trutschl, M., Cvek, U., Duzan, R.D., Bradley, C.A., Hershey, J.W., and Rhoads, R.E. (2006). Translation initiation factor eIF4G-1 binds to eIF3 through the eIF3e subunit. *The Journal of biological chemistry* 281, 22917-22932.

Lepault, J., Petitpas, I., Erk, I., Navaza, J., Bigot, D., Dona, M., Vachette, P., Cohen, J., and Rey, F.A. (2001). Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *The EMBO journal* 20, 1498-1507.

Li, S., Min, J.Y., Krug, R.M., and Sen, G.C. (2006). Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology* 349, 13-21.

Li, W., Manktelow, E., von Kirchbach, J.C., Gog, J.R., Desselberger, U., and Lever, A.M. (2010). Genomic analysis of codon, sequence and structural conservation with selective biochemical-structure mapping reveals highly conserved and dynamic structures in rotavirus RNAs with potential cis-acting functions. *Nucleic acids research* 38, 7718-7735.

Libersou, S., Siebert, X., Ouldali, M., Estrozi, L.F., Navaza, J., Charpilienne, A., Garnier, P., Poncet, D., and Lepault, J. (2008). Geometric mismatches within the concentric layers of rotavirus particles: a potential regulatory switch of viral particle transcription activity. *Journal of virology* 82, 2844-2852.

Lischka, P., Toth, Z., Thomas, M., Mueller, R., and Stamminger, T. (2006). The UL69 transactivator protein of human cytomegalovirus interacts with DEXD/H-Box RNA helicase UAP56 to promote cytoplasmic accumulation of unspliced RNA. *Molecular and cellular biology* 26, 1631-1643.

Liu, M., and Estes, M.K. (1989). Nucleotide sequence of the simian rotavirus SA11 genome segment 3. *Nucleic acids research* 17, 7991.

Liu, M., Mattion, N.M., and Estes, M.K. (1992). Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology* 188, 77-84.

Liu, Y., Huang, P., Jiang, B., Tan, M., Morrow, A.L., and Jiang, X. (2013). Poly-LacNAc as an Age-Specific Ligand for Rotavirus P[11] in Neonates and Infants. *PloS one* 8, e78113.

Liu, Y., Huang, P., Tan, M., Liu, Y., Biesiada, J., Meller, J., Castello, A.A., Jiang, B., and Jiang, X. (2012). Rotavirus VP8\*: phylogeny, host range, and interaction with histo-blood group antigens. *Journal of virology* 86, 9899-9910.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)* 25, 402-408.

Locker, N., Chamond, N., and Sargueil, B. (2010). A conserved structure within the HIV gag open reading frame that controls translation initiation directly recruits the 40S subunit and eIF3. *Nucleic acids research* 39, 2367-2377.

Locker, N., Easton, L.E., and Lukavsky, P.J. (2007). HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly. *The EMBO journal* 26, 795-805.

Lopez, T., Camacho, M., Zayas, M., Najera, R., Sanchez, R., Arias, C.F., and Lopez, S. (2005). Silencing the morphogenesis of rotavirus. *Journal of virology* 79, 184-192.

Lu, C., and Bablanian, R. (1996). Characterization of small nontranslated polyadenylated RNAs in vaccinia virus-infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 2037-2042.

Lu, L., Han, A.P., and Chen, J.J. (2001). Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses. *Molecular and cellular biology* 21, 7971-7980.

Lu, X., McDonald, S.M., Tortorici, M.A., Tao, Y.J., Vasquez-Del Carpio, R., Nibert, M.L., Patton, J.T., and Harrison, S.C. (2008). Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Structure* 16, 1678-1688.

Ludert, J.E., Ruiz, M.C., Hidalgo, C., and Liprandi, F. (2002). Antibodies to rotavirus outer capsid glycoprotein VP7 neutralize infectivity by inhibiting virion decapsidation. *Journal of virology* 76, 6643-6651.

Lynch, M., Fitzgerald, C., Johnston, K.A., Wang, S., and Schmidt, E.V. (2004). Activated eIF4E-binding protein slows G1 progression and blocks transformation by c-myc without inhibiting cell growth. *The Journal of biological chemistry* 279, 3327-3339.

## M

Ma, K., Vatter, K.M., and Wek, R.C. (2002). Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *The Journal of biological chemistry* 277, 18728-18735.

Ma, X.M., Yoon, S.O., Richardson, C.J., Julich, K., and Blenis, J. (2008). SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell* 133, 303-313.

Maass, D.R., and Atkinson, P.H. (1990). Rotavirus proteins VP7, NS28, and VP4 form oligomeric structures. *Journal of virology* 64, 2632-2641.

Maitra, R.K., McMillan, N.A., Desai, S., McSwiggen, J., Hovanessian, A.G., Sen, G., Williams, B.R., and Silverman, R.H. (1994). HIV-1 TAR RNA has an intrinsic ability to activate interferon-inducible enzymes. *Virology* 204, 823-827.

Manche, L., Green, S.R., Schmedt, C., and Mathews, M.B. (1992). Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Molecular and cellular biology* 12, 5238-5248.

Manzella, J.M., Rychlik, W., Rhoads, R.E., Hershey, J.W., and Blackshear, P.J. (1991). Insulin induction of ornithine decarboxylase. Importance of mRNA secondary structure and phosphorylation of eucaryotic initiation factors eIF-4B and eIF-4E. *The Journal of biological chemistry* 266, 2383-2389.

Marcotrigiano, J., Gingras, A.C., Sonenberg, N., and Burley, S.K. (1997). Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* 89, 951-961.

Marintchev, A., Edmonds, K.A., Marintcheva, B., Hendrickson, E., Oberer, M., Suzuki, C., Herdy, B., Sonenberg, N., and Wagner, G. (2009). Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. *Cell* 136, 447-460.

Marintchev, A., Kolupaeva, V.G., Pestova, T.V., and Wagner, G. (2003). Mapping the binding interface between human eukaryotic initiation factors 1A and 5B: a new interaction between old partners. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1535-1540.

Marshall, E.E., Bierle, C.J., Brune, W., and Geballe, A.P. (2009). Essential role for either TRS1 or IRS1 in human cytomegalovirus replication. *Journal of virology* 83, 4112-4120.

Marthaler, D., Rossow, K., Culhane, M., Goyal, S., Collins, J., Matthijssens, J., Nelson, M., and Ciarlet, M. Widespread rotavirus h in commercially raised pigs, United States. *Emerging infectious diseases* 20, 1203-1206.

Martin, D., Charpilienne, A., Parent, A., Boussac, A., D'Autreaux, B., Poupon, J., and Poncet, D. (2013). The rotavirus nonstructural protein NSP5 coordinates a [2Fe-2S] iron-sulfur cluster that modulates interaction to RNA. *Faseb J* 27, 1074-1083.

Martin, D., Ouldali, M., Menetrey, J., and Poncet, D. (2011). Structural organisation of the rotavirus nonstructural protein NSP5. *Journal of molecular biology* 413, 209-221.

Maruri-Avidal, L., Lopez, S., and Arias, C.F. (2008). Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles. *Journal of virology* 82, 5368-5380.

Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., Prasad, B.V., Cohen, J., and Rey, F.A. (2001). Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *The EMBO journal* 20, 1485-1497.

Matsuda, D., and Dreher, T.W. (2006). Close spacing of AUG initiation codons confers dicistronic character on a eukaryotic mRNA. *RNA (New York, NY)* 12, 1338-1349.

Matthijssens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijis, I., Delbeke, T., McDonald, S.M., Palombo, E.A., Iturriza-Gomara, M., Maes, P., Patton, J.T., *et al.* (2008). Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *Journal of virology* 82, 3204-3219.

Matthijssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S.M., Attoui, H., Banyai, K., Brister, J.R., Buesa, J., Esona, M.D., Estes, M.K., Gentsch, J.R., *et al.* (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of virology* 156, 1397-1413.

Mattion, N.M., Bellinzoni, R.C., Blackhall, J.O., Estes, M.K., Gonzalez, S., La Torre, J.L., and Scodeller, E.A. (1990). Genome rearrangements in porcine rotaviruses: biochemical and biological comparisons between a supershort strain and its standard counterpart. *The Journal of general virology* 71 ( Pt 2), 355-362.

Mattion, N.M., Cohen, J., Aponte, C., and Estes, M.K. (1992). Characterization of an oligomerization domain and RNA-binding properties on rotavirus nonstructural protein NS34. *Virology* 190, 68-83.

Mattion, N.M., Mitchell, D.B., Both, G.W., and Estes, M.K. (1991). Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology* 181, 295-304.

McClain, B., Settembre, E., Temple, B.R., Bellamy, A.R., and Harrison, S.C. (2010). X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *Journal of molecular biology* 397, 587-599.

McCrae, M.A., and McCorquodale, J.G. (1983). Molecular biology of rotaviruses. V. Terminal structure of viral RNA species. *Virology* 126, 204-212.

McDonald, S.M., and Patton, J.T. (2011). Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Trends in microbiology* 19, 136-144.

McKinney, C., Perez, C., and Mohr, I. (2012). Poly(A) binding protein abundance regulates eukaryotic translation initiation factor 4F assembly in human cytomegalovirus-infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 5627-5632.

Mebus, C.A., Kono, M., Underdahl, N.R., and Twiehaus, M.J. (1971). Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea (scours) virus. *The Canadian veterinary journal* 12, 69-72.



Meijer, H.A., Kong, Y.W., Lu, W.T., Wilczynska, A., Spriggs, R.V., Robinson, S.W., Godfrey, J.D., Willis, A.E., and Bushell, M. (2013). Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science (New York, NY)* **340**, 82-85.

Merkulova, T.I., Frolova, L.Y., Lazar, M., Camonis, J., and Kisselev, L.L. (1999). C-terminal domains of human translation termination factors eRF1 and eRF3 mediate their in vivo interaction. *FEBS letters* **443**, 41-47.

Michel, Y.M., Borman, A.M., Paulous, S., and Kean, K.M. (2001). Eukaryotic initiation factor 4G-poly(A) binding protein interaction is required for poly(A) tail-mediated stimulation of picornavirus internal ribosome entry segment-driven translation but not for X-mediated stimulation of hepatitis C virus translation. *Molecular and cellular biology* **21**, 4097-4109.

Michel, Y.M., Poncet, D., Piron, M., Kean, K.M., and Borman, A.M. (2000). Cap-Poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts. Investigation of the requirements for poly(A)-mediated stimulation of translation initiation. *The Journal of biological chemistry* **275**, 32268-32276.

Mir, M.A., Duran, W.A., Hjelle, B.L., Ye, C., and Panganiban, A.T. (2008). Storage of cellular 5' mRNA caps in P bodies for viral cap-snatching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 19294-19299.

Mitchell, D.B., and Both, G.W. (1990). Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequences of segments 1, 2, and 3. *Virology* **177**, 324-331.

Mitchell, S.F., Walker, S.E., Algire, M.A., Park, E.H., Hinnebusch, A.G., and Lorsch, J.R. (2010). The 5'-7-methylguanosine cap on eukaryotic mRNAs serves both to stimulate canonical translation initiation and to block an alternative pathway. *Molecular cell* **39**, 950-962.

Mohr, I., Pe'ery, T., and Mathews, M.B. (2007). Protein Synthesis and Translational Control during Viral Infection. Book : Translational Control in Biology and Medicine (Cold Spring Harbor Monograph Series 48), 545-599.

Montero, H., Arias, C.F., and Lopez, S. (2006). Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *Journal of virology* **80**, 9031-9038.

Montero, H., Rojas, M., Arias, C.F., and Lopez, S. (2008). Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. *Journal of virology* **82**, 1496-1504.

Moody, C.A., Scott, R.S., Amirghahari, N., Nathan, C.O., Young, L.S., Dawson, C.W., and Sixbey, J.W. (2005). Modulation of the cell growth regulator mTOR by Epstein-Barr virus-encoded LMP2A. *Journal of virology* **79**, 5499-5506.

Moorman, N.J., Cristea, I.M., Terhune, S.S., Rout, M.P., Chait, B.T., and Shenk, T. (2008). Human cytomegalovirus protein UL38 inhibits host cell stress responses by antagonizing the tuberous sclerosis protein complex. *Cell host & microbe* **3**, 253-262.

Morley, S.J., and Naegele, S. (2002). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor (eIF) 4E is not required for de novo protein synthesis following recovery from hypertonic stress in human kidney cells. *The Journal of biological chemistry* **277**, 32855-32859.

Mossel, E.C., and Ramig, R.F. (2002). Rotavirus genome segment 7 (NSP3) is a determinant of extraintestinal spread in the neonatal mouse. *Journal of virology* **76**, 6502-6509.

Mossel, E.C., and Ramig, R.F. (2003). A lymphatic mechanism of rotavirus extraintestinal spread in the neonatal mouse. *Journal of virology* **77**, 12352-12356.

Mulvey, M., Arias, C., and Mohr, I. (2007). Maintenance of endoplasmic reticulum (ER) homeostasis in herpes simplex virus type 1-infected cells through the association of a viral glycoprotein with PERK, a cellular ER stress sensor. *Journal of virology* **81**, 3377-3390.

Mulvey, M., Poppers, J., Ladd, A., and Mohr, I. (1999). A herpesvirus ribosome-associated, RNA-binding protein confers a growth advantage upon mutants deficient in a GADD34-related function. *Journal of virology* **73**, 3375-3385.

Mulvey, M., Poppers, J., Sternberg, D., and Mohr, I. (2003). Regulation of eIF2alpha phosphorylation by different functions that act during discrete phases in the herpes simplex virus type 1 life cycle. *Journal of virology* **77**, 10917-10928.

Musalem, C., and Espejo, R.T. (1985). Release of progeny virus from cells infected with simian rotavirus SA11. *The Journal of general virology* **66** ( Pt 12), 2715-2724.

## N

Nanda, J.S., Cheung, Y.N., Takacs, J.E., Martin-Marcos, P., Saini, A.K., Hinnebusch, A.G., and Lorsch, J.R. (2009). eIF1 controls multiple steps in start codon recognition during eukaryotic translation initiation. *Journal of molecular biology* **394**, 268-285.

Nanduri, S., Rahman, F., Williams, B.R., and Qin, J. (2000). A dynamically tuned double-stranded RNA binding mechanism for the activation of antiviral kinase PKR. *The EMBO journal* **19**, 5567-5574.

Naveau, M., Lazennec-Schurdevin, C., Panvert, M., Mechulam, Y., and Schmitt, E. (2010). tRNA binding properties of eukaryotic translation initiation factor 2 from *Encephalitozoon cuniculi*. *Biochemistry* **49**, 8680-8688.

Nho, R.S., and Peterson, M. (2011). Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (4EBP-1) function is suppressed by Src and protein phosphatase 2A (PP2A) on extracellular matrix. *The Journal of biological chemistry* 286, 31953-31965.

Nibert, M.L., Margraf, R.L., and Coombs, K.M. (1996). Nonrandom segregation of parental alleles in reovirus reassortants. *Journal of virology* 70, 7295-7300.

Niedzwiecka, A., Marcotrigiano, J., Stepinski, J., Jankowska-Anyszka, M., Wyslouch-Cieszyńska, A., Dadlez, M., Gingras, A.C., Mak, P., Darzynkiewicz, E., Sonenberg, N., *et al.* (2002). Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. *Journal of molecular biology* 319, 615-635.

Nielsen, K.H., Behrens, M.A., He, Y., Oliveira, C.L., Jensen, L.S., Hoffmann, S.V., Pedersen, J.S., and Andersen, G.R. (2011). Synergistic activation of eIF4A by eIF4B and eIF4G. *Nucleic acids research* 39, 2678-2689.

## O

O'Malley, R.P., Duncan, R.F., Hershey, J.W., and Mathews, M.B. (1989). Modification of protein synthesis initiation factors and the shut-off of host protein synthesis in adenovirus-infected cells. *Virology* 168, 112-118.

O'Neill, R.E., and Racaniello, V.R. (1989). Inhibition of translation in cells infected with a poliovirus 2Apro mutant correlates with phosphorylation of the alpha subunit of eucaryotic initiation factor 2. *Journal of virology* 63, 5069-5075.

Oberer, M., Marintchev, A., and Wagner, G. (2005). Structural basis for the enhancement of eIF4A helicase activity by eIF4G. *Genes & development* 19, 2212-2223.

Oh, W.J., Wu, C.C., Kim, S.J., Facchinetti, V., Julien, L.A., Finlan, M., Roux, P.P., Su, B., and Jacinto, E. (2010). mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. *The EMBO journal* 29, 3939-3951.

Oishi, I., Kimura, T., Murakami, T., Haruki, K., Yamazaki, K., Seto, Y., Minekawa, Y., and Funamoto, H. (1991). Serial observations of chronic rotavirus infection in an immunodeficient child. *Microbiology and immunology* 35, 953-961.

Okada, J., Kobayashi, N., Taniguchi, K., and Shiomi, H. (1999). Functional analysis of the heterologous NSP1 genes in the genetic background of simian rotavirus SA11. *Arch Virol* 144, 1439-1449.

Olsen, D.S., Savner, E.M., Mathew, A., Zhang, F., Krishnamoorthy, T., Phan, L., and Hinnebusch, A.G. (2003). Domains of eIF1A that mediate binding to eIF2, eIF3 and eIF5B and promote ternary complex recruitment in vivo. *The EMBO journal* 22, 193-204.

Ozes, A.R., Feoktistova, K., Avanzino, B.C., and Fraser, C.S. (2011). Duplex unwinding and ATPase activities of the DEAD-box helicase eIF4A are coupled by eIF4G and eIF4B. *Journal of molecular biology* 412, 674-687.

## P

Padilla-Noriega, L., Paniagua, O., and Guzman-Leon, S. (2002). Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis. *Virology* 298, 1-7.

Parashar, U.D., Burton, A., Lanata, C., Boschi-Pinto, C., Shibuya, K., Steele, D., Birmingham, M., and Glass, R.I. (2009). Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *The Journal of infectious diseases* 200 Suppl 1, S9-S15.

Park, E.H., Walker, S.E., Lee, J.M., Rothenburg, S., Lorsch, J.R., and Hinnebusch, A.G. (2011a). Multiple elements in the eIF4G1 N-terminus promote assembly of eIF4G1\*PABP mRNPs in vivo. *The EMBO journal* 30, 302-316.

Park, E.H., Zhang, F., Warringer, J., Sunnerhagen, P., and Hinnebusch, A.G. (2011b). Depletion of eIF4G from yeast cells narrows the range of translational efficiencies genome-wide. *BMC genomics* 12, 68.

Parrish, S., and Moss, B. (2007). Characterization of a second vaccinia virus mRNA-decapping enzyme conserved in poxviruses. *Journal of virology* 81, 12973-12978.

Parrish, S., Resch, W., and Moss, B. (2007). Vaccinia virus D10 protein has mRNA decapping activity, providing a mechanism for control of host and viral gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 2139-2144.

Parsyan, A., Shahbazian, D., Martineau, Y., Petroulakis, E., Alain, T., Larsson, O., Mathonnet, G., Tettweiler, G., Hellen, C.U., Pestova, T.V., *et al.* (2009). The helicase protein DHX29 promotes translation initiation, cell proliferation, and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 22217-22222.

Passmore, L.A., Schmeing, T.M., Maag, D., Applefield, D.J., Acker, M.G., Algire, M.A., Lorsch, J.R., and Ramakrishnan, V. (2007). The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. *Molecular cell* 26, 41-50.

Patton, J.T. (1996). Rotavirus VP1 alone specifically binds to the 3' end of viral mRNA, but the interaction is not sufficient to initiate minus-strand synthesis. *Journal of virology* 70, 7940-7947.

Patton, J.T. (2001). Rotavirus RNA replication and gene expression. *Novartis Foundation symposium* 238, 64-77; discussion 77-81.

Patton, J.T., and Gallegos, C.O. (1988). Structure and protein composition of the rotavirus replicase particle. *Virology* 166, 358-365.

Patton, J.T., Jones, M.T., Kalbach, A.N., He, Y.W., and Xiaobo, J. (1997). Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *Journal of virology* 71, 9618-9626.

Patton, J.T., and Spencer, E. (2000). Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology* 277, 217-225.

Pause, A., Belsham, G.J., Gingras, A.C., Donze, O., Lin, T.A., Lawrence, J.C., Jr., and Sonenberg, N. (1994). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371, 762-767.

Pavio, N., Romano, P.R., Graczyk, T.M., Feinstone, S.M., and Taylor, D.R. (2003). Protein synthesis and endoplasmic reticulum stress can be modulated by the hepatitis C virus envelope protein E2 through the eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase PERK. *Journal of virology* 77, 3578-3585.

Pedley, S., Hundley, F., Chrystie, I., McCrae, M.A., and Desselberger, U. (1984). The genomes of rotaviruses isolated from chronically infected immunodeficient children. *The Journal of general virology* 65 ( Pt 7), 1141-1150.

Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334, 320-325.

Perez, C., McKinney, C., Chulunbaatar, U., and Mohr, I. (2011). Translational control of the abundance of cytoplasmic poly(A) binding protein in human cytomegalovirus-infected cells. *Journal of virology* 85, 156-164.

Pestova, T., Lorsch, J.R., and Hellen, C.U. (2007). The Mechanism of Translation Initiation in Eucaryotes. *Translational Control in Biology and Medecine de Mathwes MB, Sonenberg N, Hershey JWB* 87.

Pestova, T.V., de Breyne, S., Pisarev, A.V., Abaeva, I.S., and Hellen, C.U. (2008). eIF2-dependent and eIF2-independent modes of initiation on the CSFV IRES: a common role of domain II. *The EMBO journal* 27, 1060-1072.

Pestova, T.V., and Kolupaeva, V.G. (2002). The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes & development* 16, 2906-2922.

Petrie, B.L., Greenberg, H.B., Graham, D.Y., and Estes, M.K. (1984). Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold. *Virus research* 1, 133-152.

Petroulakis, E., Parsyan, A., Dowling, R.J., LeBacquer, O., Martineau, Y., Bidinosti, M., Larsson, O., Alain, T., Rong, L., Mamane, Y., *et al.* (2009). p53-dependent translational control of senescence and transformation via 4E-BPs. *Cancer cell* 16, 439-446.

Piron, M., Delaunay, T., Grosclaude, J., and Poncet, D. (1999). Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *Journal of virology* 73, 5411-5421.

Piron, M., Vende, P., Cohen, J., and Poncet, D. (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *The EMBO journal* 17, 5811-5821.

Pisarev, A.V., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2007a). Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell* 131, 286-299.

Pisarev, A.V., Kolupaeva, V.G., Pisareva, V.P., Merrick, W.C., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2006). Specific functional interactions of nucleotides at key -3 and +4 positions flanking the initiation codon with components of the mammalian 48S translation initiation complex. *Genes & development* 20, 624-636.

Pisarev, A.V., Unbehauen, A., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2007b). Assembly and analysis of eukaryotic translation initiation complexes. *Methods in enzymology* 430, 147-177.

Pisareva, V.P., Pisarev, A.V., Komar, A.A., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2008). Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DEXH-box protein DHX29. *Cell* 135, 1237-1250.

Pizarro, J.L., Sandino, A.M., Pizarro, J.M., Fernandez, J., and Spencer, E. (1991). Characterization of rotavirus guanylyltransferase activity associated with polypeptide VP3. *The Journal of general virology* 72 ( Pt 2), 325-332.

Plotch, S.J., Bouloy, M., Ulmanen, I., and Krug, R.M. (1981). A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* 23, 847-858.

Pocock, D.H. (1987). Isolation and characterization of two group A rotaviruses with unusual genome profiles. *The Journal of general virology* 68 ( Pt 3), 653-660.

Poncet, D., Aponte, C., and Cohen, J. (1993). Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *Journal of virology* 67, 3159-3165.

Poncet, D., Laurent, S., and Cohen, J. (1994). Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *The EMBO journal* 13, 4165-4173.

Poncet, D., Lindenbaum, P., L'Haridon, R., and Cohen, J. (1997). In vivo and in vitro phosphorylation of rotavirus NSP5 correlates with its localization in viroplasm. *Journal of virology* 71, 34-41.

Poppers, J., Mulvey, M., Perez, C., Khoo, D., and Mohr, I. (2003). Identification of a lytic-cycle Epstein-Barr virus gene product that can regulate PKR activation. *Journal of virology* 77, 228-236.

Poyry, T.A., Kaminski, A., Connell, E.J., Fraser, C.S., and Jackson, R.J. (2007). The mechanism of an exceptional case of reinitiation after translation of a long ORF reveals why such events do not generally occur in mammalian mRNA translation. *Genes & development* 21, 3149-3162.

Prasad, B.V., Burns, J.W., Marietta, E., Estes, M.K., and Chiu, W. (1990). Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature* 343, 476-479.

Prasad, B.V., Rothnagel, R., Zeng, C.Q., Jakana, J., Lawton, J.A., Chiu, W., and Estes, M.K. (1996). Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature* 382, 471-473.

Prasad, B.V., Wang, G.J., Clerx, J.P., and Chiu, W. (1988). Three-dimensional structure of rotavirus. *Journal of molecular biology* 199, 269-275.

Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A.C., Fukunaga, R., Hunter, T., and Sonenberg, N. (1999). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *The EMBO journal* 18, 270-279.

## R

Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S.F., Haag, A., and Ban, N. (2011). Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science (New York, NY)* 331, 730-736.

Rainsford, E.W., and McCrae, M.A. (2007). Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11. *Virus research* 130, 193-201.

Ramani, S., Cortes-Penfield, N.W., Hu, L., Crawford, S.E., Czako, R., Smith, D.F., Kang, G., Ramig, R.F., Le Pendu, J., Prasad, B.V., *et al.* (2013). The VP8\* domain of neonatal rotavirus strain G10P[11] binds to type II precursor glycans. *Journal of virology* 87, 7255-7264.

Ramig, R.F. (1982). Isolation and genetic characterization of temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11. *Virology* 120, 93-105.

Ramig, R.F. (1997). Genetics of the rotaviruses. *Annual review of microbiology* 51, 225-255.

Ramig, R.F., and Petrie, B.L. (1984). Characterization of temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11: protein synthesis and morphogenesis. *Journal of virology* 49, 665-673.

Ramirez-Valle, F., Braunstein, S., Zavadil, J., Formenti, S.C., and Schneider, R.J. (2008). eIF4GI links nutrient sensing by mTOR to cell proliferation and inhibition of autophagy. *The Journal of cell biology* 181, 293-307.

Raught, B., Peiretti, F., Gingras, A.C., Livingstone, M., Shahbazian, D., Mayeur, G.L., Polakiewicz, R.D., Sonenberg, N., and Hershey, J.W. (2004). Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *The EMBO journal* 23, 1761-1769.

Redondo, N., Sanz, M.A., Welnowska, E., and Carrasco, L. (2011). Translation without eIF2 promoted by poliovirus 2A protease. *PloS one* 6, e25699.

Reguera, J., Weber, F., and Cusack, S. (2010). Bunyaviridae RNA polymerases (L-protein) have an N-terminal, influenza-like endonuclease domain, essential for viral cap-dependent transcription. *PLoS pathogens* 6, e1001101.

Richardson, C.J., Broenstrup, M., Fingar, D.C., Julich, K., Ballif, B.A., Gygi, S., and Blenis, J. (2004). SKAR is a specific target of S6 kinase 1 in cell growth control. *Curr Biol* 14, 1540-1549.

Robert, F., Kapp, L.D., Khan, S.N., Acker, M.G., Kolitz, S., Kazemi, S., Kaufman, R.J., Merrick, W.C., Koromilas, A.E., Lorsch, J.R., *et al.* (2006). Initiation of protein synthesis by hepatitis C virus is refractory to reduced eIF2.GTP.Met-tRNA(i)(Met) ternary complex availability. *Molecular biology of the cell* 17, 4632-4644.

Rodriguez, J.M., Chichon, F.J., Martin-Forero, E., Gonzalez-Camacho, F., Carrascosa, J.L., Caston, J.R., and Luque, D. (2014). New insights into rotavirus entry machinery: stabilization of rotavirus spike conformation is independent of trypsin cleavage. *PLoS pathogens* 10, e1004157.

Rodriguez Pulido, M., Serrano, P., Saiz, M., and Martinez-Salas, E. (2007). Foot-and-mouth disease virus infection induces proteolytic cleavage of PTB, eIF3a,b, and PABP RNA-binding proteins. *Virology* 364, 466-474.

Rogers, G.W., Jr., Richter, N.J., Lima, W.F., and Merrick, W.C. (2001). Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *The Journal of biological chemistry* 276, 30914-30922.

Rojas, M., Arias, C.F., and Lopez, S. (2010). Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2alpha in rotavirus infection. *Journal of virology* 84, 10457-10466.

Rothenburg, S., Chinchar, V.G., and Dever, T.E. (2011). Characterization of a ranavirus inhibitor of the antiviral protein kinase PKR. *BMC microbiology* 11, 56.

Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T.E., Merrick, W.C., and Sonenberg, N. (1990). Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Molecular and cellular biology* 10, 1134-1144.

Rozovsky, N., Butterworth, A.C., and Moore, M.J. (2008). Interactions between eIF4AI and its accessory factors eIF4B and eIF4H. *RNA (New York, NY)* 14, 2136-2148.

Rubio, R.M., Mora, S.I., Romero, P., Arias, C.F., and Lopez, S. (2013). Rotavirus prevents the expression of host responses by blocking the nucleocytoplasmic transport of polyadenylated mRNAs. *Journal of virology* 87, 6336-6345.

Ruggeri, F.M., and Greenberg, H.B. (1991). Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *Journal of virology* 65, 2211-2219.

Ruiz, M.C., Aristimuno, O.C., Diaz, Y., Pena, F., Chemello, M.E., Rojas, H., Ludert, J.E., and Michelangeli, F. (2007). Intracellular disassembly of infectious rotavirus particles by depletion of Ca<sup>2+</sup> sequestered in the endoplasmic reticulum at the end of virus cycle. *Virus research* 130, 140-150.

# S

- Safaee, N., Kozlov, G., Noronha, A.M., Xie, J., Wilds, C.J., and Gehring, K. (2012). Interdomain allostery promotes assembly of the poly(A) mRNA complex with PABP and eIF4G. *Molecular cell* 48, 375-386.
- Salvatore, M., Basler, C.F., Parisien, J.P., Horvath, C.M., Bourmakina, S., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., and Garcia-Sastre, A. (2002). Effects of influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein enhances translation and is not required for shutoff of host protein synthesis. *Journal of virology* 76, 1206-1212.
- Sanghvi, V.R., and Steel, L.F. (2011). The cellular TAR RNA binding protein, TRBP, promotes HIV-1 replication primarily by inhibiting the activation of double-stranded RNA-dependent kinase PKR. *Journal of virology* 85, 12614-12621.
- Sapin, C., Colard, O., Delmas, O., Tessier, C., Breton, M., Enouf, V., Chwetzoff, S., Ouanich, J., Cohen, J., Wolf, C., *et al.* (2002). Rafts promote assembly and atypical targeting of a nonenveloped virus, rotavirus, in Caco-2 cells. *Journal of virology* 76, 4591-4602.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 14, 1296-1302.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Current opinion in cell biology* 17, 596-603.
- Sato, H., Masuda, M., Kanai, M., Tsukiyama-Kohara, K., Yoneda, M., and Kai, C. (2007). Measles virus N protein inhibits host translation by binding to eIF3-p40. *Journal of virology* 81, 11569-11576.
- Schepetilnikov, M., Kobayashi, K., Geldreich, A., Caranta, C., Robaglia, C., Keller, M., and Ryabova, L.A. (2011). Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate reinitiation after long ORF translation. *The EMBO journal* 30, 1343-1356.
- Schmedt, C., Green, S.R., Manche, L., Taylor, D.R., Ma, Y., and Mathews, M.B. (1995). Functional characterization of the RNA-binding domain and motif of the double-stranded RNA-dependent protein kinase DAI (PKR). *Journal of molecular biology* 249, 29-44.
- Schnepf, N., Deback, C., Dehee, A., Gault, E., Perez, N., and Garbarg-Chenon, A. (2008). Rearrangements of rotavirus genomic segment 11 are generated during acute infection of immunocompetent children and do not occur at random. *Journal of virology* 82, 3689-3696.
- Schuck, P., Taraporewala, Z., McPhie, P., and Patton, J.T. (2001). Rotavirus nonstructural protein NSP2 self-assembles into octamers that undergo ligand-induced conformational changes. *The Journal of biological chemistry* 276, 9679-9687.
- Schutz, P., Bumann, M., Oberholzer, A.E., Bieniossek, C., Trachsel, H., Altmann, M., and Baumann, U. (2008). Crystal structure of the yeast eIF4A-eIF4G complex: an RNA-helicase controlled by protein-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 9564-9569.
- Schwartz-Cornil, I., Benureau, Y., Greenberg, H., Hendrickson, B.A., and Cohen, J. (2002). Heterologous protection induced by the inner capsid proteins of rotavirus requires transcytosis of mucosal immunoglobulins. *Journal of virology* 76, 8110-8117.
- Searfoss, A.M., and Wickner, R.B. (2000). 3' poly(A) is dispensable for translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 9133-9137.
- Sen, A., Feng, N., Ettayebi, K., Hardy, M.E., and Greenberg, H.B. (2009). IRF3 inhibition by rotavirus NSP1 is host cell and virus strain dependent but independent of NSP1 proteasomal degradation. *Journal of virology* 83, 10322-10335.
- Sen, A., Sen, N., and Mackow, E.R. (2007). The formation of viroplasm-like structures by the rotavirus NSP5 protein is calcium regulated and directed by a C-terminal helical domain. *Journal of virology* 81, 11758-11767.
- Seo, E.J., Liu, F., Kawagishi-Kobayashi, M., Ung, T.L., Cao, C., Dar, A.C., Sicheri, F., and Dever, T.E. (2008). Protein kinase PKR mutants resistant to the poxvirus pseudosubstrate K3L protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 16894-16899.
- Settembre, E.C., Chen, J.Z., Dormitzer, P.R., Grigorieff, N., and Harrison, S.C. (2011). Atomic model of an infectious rotavirus particle. *The EMBO journal* 30, 408-416.
- Shahbazian, D., Parsyan, A., Petroulakis, E., Topisirovic, I., Martineau, Y., Gibbs, B.F., Svitkin, Y., and Sonenberg, N. (2010). Control of cell survival and proliferation by mammalian eukaryotic initiation factor 4B. *Molecular and cellular biology* 30, 1478-1485.
- Shahbazian, D., Roux, P.P., Mieulet, V., Cohen, M.S., Raught, B., Taunton, J., Hershey, J.W., Blenis, J., Pende, M., and Sonenberg, N. (2006). The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *The EMBO journal* 25, 2781-2791.
- Sharp, T.V., Moonan, F., Romashko, A., Joshi, B., Barber, G.N., and Jagus, R. (1998). The vaccinia virus E3L gene product interacts with both the regulatory and the substrate binding regions of PKR: implications for PKR autoregulation. *Virology* 250, 302-315.
- Shaw, A.L., Rothnagel, R., Chen, D., Ramig, R.F., Chiu, W., and Prasad, B.V. (1993). Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure. *Cell* 74, 693-701.

Shoemaker, C.J., and Green, R. (2011). Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, E1392-1398.

Shuda, M., Kwun, H.J., Feng, H., Chang, Y., and Moore, P.S. (2011). Human Merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator. *The Journal of clinical investigation* 121, 3623-3634.

Silvestri, L.S., Taraporewala, Z.F., and Patton, J.T. (2004). Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm. *Journal of virology* 78, 7763-7774.

Silvestri, L.S., Tortorici, M.A., Vasquez-Del Carpio, R., and Patton, J.T. (2005). Rotavirus glycoprotein NSP4 is a modulator of viral transcription in the infected cell. *Journal of virology* 79, 15165-15174.

Singh, C.R., Lee, B., Udagawa, T., Mohammad-Qureshi, S.S., Yamamoto, Y., Pavitt, G.D., and Asano, K. (2006). An eIF5/eIF2 complex antagonizes guanine nucleotide exchange by eIF2B during translation initiation. *The EMBO journal* 25, 4537-4546.

Singh, C.R., Udagawa, T., Lee, B., Wassink, S., He, H., Yamamoto, Y., Anderson, J.T., Pavitt, G.D., and Asano, K. (2007). Change in nutritional status modulates the abundance of critical pre-initiation intermediate complexes during translation initiation in vivo. *Journal of molecular biology* 370, 315-330.

Skabkin, M.A., Skabkina, O.V., Dhote, V., Komar, A.A., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2010). Activities of Ligatin and MCT-1/DENR in eukaryotic translation initiation and ribosomal recycling. *Genes & development* 24, 1787-1801.

Sodhi, A., Chaisuparat, R., Hu, J., Ramsdell, A.K., Manning, B.D., Sausville, E.A., Sawai, E.T., Molinolo, A., Gutkind, J.S., and Montaner, S. (2006). The TSC2/mTOR pathway drives endothelial cell transformation induced by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor. *Cancer cell* 10, 133-143.

Sonenberg, N. (2008). eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 86, 178-183.

Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731-745.

Sonenberg, N., Morgan, M.A., Merrick, W.C., and Shatkin, A.J. (1978). A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 4843-4847.

Sonenberg, N., Rupprecht, K.M., Hecht, S.M., and Shatkin, A.J. (1979). Eukaryotic mRNA cap binding protein: purification by affinity chromatography on sepharose-coupled m7GDP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4345-4349.

Song, H., Mugnier, P., Das, A.K., Webb, H.M., Evans, D.R., Tuite, M.F., Hemmings, B.A., and Barford, D. (2000). The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1--mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell* 100, 311-321.

Spahn, C.M., Jan, E., Mulder, A., Grassucci, R.A., Sarnow, P., and Frank, J. (2004). Cryo-EM visualization of a viral internal ribosome entry site bound to human ribosomes: the IRES functions as an RNA-based translation factor. *Cell* 118, 465-475.

Spangle, J.M., and Munger, K. (2010). The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein activates mTORC1 signaling and increases protein synthesis. *Journal of virology* 84, 9398-9407.

Spirin, A.S. (2009). How does a scanning ribosomal particle move along the 5'-untranslated region of eukaryotic mRNA? Brownian Ratchet model. *Biochemistry* 48, 10688-10692.

Stalder, L., Heusermann, W., Sokol, L., Trojer, D., Wirz, J., Hean, J., Fritzsche, A., Aeschmann, F., Pfanzagl, V., Basselet, P., *et al.* (2013). The rough endoplasmic reticulum is a central nucleation site of siRNA-mediated RNA silencing. *The EMBO journal* 32, 1115-1127.

Stansfield, I., Jones, K.M., Kushnirov, V.V., Dagkesamanskaya, A.R., Poznyakovski, A.I., Paushkin, S.V., Nierras, C.R., Cox, B.S., Ter-Avanesyan, M.D., and Tuite, M.F. (1995). The products of the SUP45 (eRF1) and SUP35 genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* 14, 4365-4373.

Stepinski, J., Waddell, C., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E., and Rhoads, R.E. (2001). Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3'-deoxy)GpppG. *RNA (New York, NY)* 7, 1486-1495.

Svitkin, Y.V., Costa-Mattioli, M., Herdy, B., Perreault, S., and Sonenberg, N. (2007). Stimulation of picornavirus replication by the poly(A) tail in a cell-free extract is largely independent of the poly(A) binding protein (PABP). *RNA (New York, NY)* 13, 2330-2340.

Svitkin, Y.V., Pause, A., Haghighat, A., Pyronnet, S., Witherell, G., Belsham, G.J., and Sonenberg, N. (2001). The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *RNA (New York, NY)* 7, 382-394.

Sweeney, T.R., Abaeva, I.S., Pestova, T.V., and Hellen, C.U. (2014). The mechanism of translation initiation on Type 1 picornavirus IRESs. *The EMBO journal* 33, 76-92.

Sweeney, T.R., Dhote, V., Yu, Y., and Hellen, C.U. (2011). A distinct class of internal ribosomal entry site in members of the Kobuvirus and proposed Salivirus and Paraturdivirus genera of the Picornaviridae. *Journal of virology* 86, 1468-1486.

Szymczak, A.L., Workman, C.J., Wang, Y., Vignali, K.M., Dilioglou, S., Vanin, E.F., and Vignali, D.A. (2004). Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nature biotechnology* 22, 589-594.

## T

Taniguchi, K., Kojima, K., Kobayashi, N., Urasawa, T., and Urasawa, S. (1996a). Structure and function of rotavirus NSP1. *Archives of virology* 12, 53-58.

Taniguchi, K., Kojima, K., and Urasawa, S. (1996b). Nondefective rotavirus mutants with an NSP1 gene which has a deletion of 500 nucleotides, including a cysteine-rich zinc finger motif-encoding region (nucleotides 156 to 248), or which has a nonsense codon at nucleotides 153-155. *Journal of virology* 70, 4125-4130.

Taniguchi, K., and Urasawa, S. (1995). Diversity in genome rotavirus. *Seminars in Virology* 6.

Taniguchi, K., Urasawa, T., Kobayashi, N., Gorziglia, M., and Urasawa, S. (1990). Nucleotide sequence of VP4 and VP7 genes of human rotaviruses with subgroup I specificity and long RNA pattern: implication for new G serotype specificity. *Journal of virology* 64, 5640-5644.

Taraporewala, Z., Chen, D., and Patton, J.T. (1999). Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. *Journal of virology* 73, 9934-9943.

Taraporewala, Z.F., and Patton, J.T. (2004). Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *Virus research* 101, 57-66.

Taraporewala, Z.F., Schuck, P., Ramig, R.F., Silvestri, L., and Patton, J.T. (2002). Analysis of a temperature-sensitive mutant rotavirus indicates that NSP2 octamers are the functional form of the protein. *Journal of virology* 76, 7082-7093.

Tarun, S.Z., Jr., Wells, S.E., Deardorff, J.A., and Sachs, A.B. (1997). Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly(A) tail-dependent translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 9046-9051.

Tate, J.E., Burton, A.H., Boschi-Pinto, C., Steele, A.D., Duque, J., and Parashar, U.D. (2012). 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases* 12, 136-141.

Taylor, D.R., Shi, S.T., Romano, P.R., Barber, G.N., and Lai, M.M. (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science (New York, NY)* 285, 107-110.

Thouless, M.E., DiGiacomo, R.F., and Neuman, D.S. (1986). Isolation of two lapine rotaviruses: characterization of their subgroup, serotype and RNA electrophoretotypes. *Archives of virology* 89, 161-170.

Thouvenin, E., Schoehn, G., Rey, F., Petitpas, I., Mathieu, M., Vaney, M.C., Cohen, J., Kohli, E., Pothier, P., and Hewat, E. (2001). Antibody inhibition of the transcriptase activity of the rotavirus DLP: a structural view. *Journal of molecular biology* 307, 161-172.

Tian, P., Ball, J.M., Zeng, C.Q., and Estes, M.K. (1996). The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity. *Journal of virology* 70, 6973-6981.

Tian, Y., Tarlow, O., Ballard, A., Desselberger, U., and McCrae, M.A. (1993). Genomic concatemerization/deletion in rotaviruses: a new mechanism for generating rapid genetic change of potential epidemiological importance. *Journal of virology* 67, 6625-6632.

Topisirovic, I., Ruiz-Gutierrez, M., and Borden, K.L. (2004). Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities. *Cancer research* 64, 8639-8642.

Torres-Vega, M.A., Gonzalez, R.A., Duarte, M., Poncet, D., Lopez, S., and Arias, C.F. (2000). The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *The Journal of general virology* 81, 821-830.

Tortorici, M.A., Broering, T.J., Nibert, M.L., and Patton, J.T. (2003). Template recognition and formation of initiation complexes by the replicase of a segmented double-stranded RNA virus. *The Journal of biological chemistry* 278, 32673-32682.

Tortorici, M.A., Shapiro, B.A., and Patton, J.T. (2006). A base-specific recognition signal in the 5' consensus sequence of rotavirus plus-strand RNAs promotes replication of the double-stranded RNA genome segments. *RNA (New York, NY)* 12, 133-146.

Trask, S.D., and Dormitzer, P.R. (2006). Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins. *Journal of virology* 80, 11293-11304.

Trask, S.D., Kim, I.S., Harrison, S.C., and Dormitzer, P.R. (2010). A rotavirus spike protein conformational intermediate binds lipid bilayers. *Journal of virology* 84, 1764-1770.

Trask, S.D., McDonald, S.M., and Patton, J.T. (2012). Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nature reviews* 10, 165-177.

Trono, D., Andino, R., and Baltimore, D. (1988a). An RNA sequence of hundreds of nucleotides at the 5' end of poliovirus RNA is involved in allowing viral protein synthesis. *Journal of virology* 62, 2291-2299.

Trono, D., Pelletier, J., Sonenberg, N., and Baltimore, D. (1988b). Translation in mammalian cells of a gene linked to the poliovirus 5' noncoding region. *Science (New York, NY)* 241, 445-448.

Troupin, C., Dehee, A., Schnuriger, A., Vende, P., Poncet, D., and Garbarg-Chenon, A. (2010). Rearranged genomic RNA segments offer a new approach to the reverse genetics of rotaviruses. *Journal of virology* 84, 6711-6719.

Troupin, C., Schnuriger, A., Duponchel, S., Deback, C., Schnepf, N., Dehee, A., and Garbarg-Chenon, A. (2011). Rotavirus rearranged genomic RNA segments are preferentially packaged into viruses despite not conferring selective growth advantage to viruses. *PloS one* 6, e20080.

Trujillo-Alonso, V., Maruri-Avidal, L., Arias, C.F., and Lopez, S. (2011). Rotavirus infection induces the unfolded protein response of the cell and controls it through the nonstructural protein NSP3. *Journal of virology* 85, 12594-12604.

## U

Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukuyama, H., Nagata, S., and Fukunaga, R. (2004). Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. *Molecular and cellular biology* 24, 6539-6549.

## V

Vascotto, F., Campagna, M., Visintin, M., Cattaneo, A., and Burrone, O.R. (2004). Effects of intrabodies specific for rotavirus NSP5 during the virus replicative cycle. *The Journal of general virology* 85, 3285-3290.

Vasquez, M., Sandino, A.M., Pizarro, J.M., Fernandez, J., Valenzuela, S., and Spencer, E. (1993). Function of rotavirus VP3 polypeptide in viral morphogenesis. *The Journal of general virology* 74 ( Pt 5), 937-941.

Vende, P., Gratia, M., Duarte, M.D., Charpilienne, A., Saguy, M., and Poncet, D. (2013). Identification of mutations in the genome of rotavirus SA11 temperature-sensitive mutants D, H, I and J by whole genome sequences analysis and assignment of tsI to gene 7 encoding NSP3. *Virus research* 176, 144-154.

Vende, P., Piron, M., Castagne, N., and Poncet, D. (2000). Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *Journal of virology* 74, 7064-7071.

Vende, P., Tortorici, M.A., Taraporewala, Z.F., and Patton, J.T. (2003). Rotavirus NSP2 interferes with the core lattice protein VP2 in initiation of minus-strand synthesis. *Virology* 313, 261-273.

Ventoso, I., Sanz, M.A., Molina, S., Berlanga, J.J., Carrasco, L., and Esteban, M. (2006). Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes & development* 20, 87-100.

Vitour, D. (2004). Interaction de la protéine non structurale NSP3 de Rotavirus avec la protéine cellulaire RoXaN Université Paris XI, Faculté de pharmacie de Chatenay-Malabry  
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué.

Vitour, D., Lindenbaum, P., Vende, P., Becker, M.M., and Poncet, D. (2004). RoXaN, a novel cellular protein containing TPR, LD, and zinc finger motifs, forms a ternary complex with eukaryotic initiation factor 4G and rotavirus NSP3. *Journal of virology* 78, 3851-3862.

Volpon, L., Osborne, M.J., Topisirovic, I., Siddiqui, N., and Borden, K.L. (2006). Cap-free structure of eIF4E suggests a basis for conformational regulation by its ligands. *The EMBO journal* 25, 5138-5149.

von der Haar, T., Gross, J.D., Wagner, G., and McCarthy, J.E. (2004). The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nature structural & molecular biology* 11, 503-511.

Vyas, J., Elia, A., and Clemens, M.J. (2003). Inhibition of the protein kinase PKR by the internal ribosome entry site of hepatitis C virus genomic RNA. *RNA (New York, NY)* 9, 858-870.

## W

Walsh, D., Arias, C., Perez, C., Halladin, D., Escandon, M., Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukunaga, R., and Mohr, I. (2008). Eukaryotic translation initiation factor 4F architectural alterations accompany translation initiation factor redistribution in poxvirus-infected cells. *Molecular and cellular biology* 28, 2648-2658.

Walsh, D., and Mohr, I. (2004). Phosphorylation of eIF4E by Mnk-1 enhances HSV-1 translation and replication in quiescent cells. *Genes & development* 18, 660-672.

Walsh, D., and Mohr, I. (2006). Assembly of an active translation initiation factor complex by a viral protein. *Genes & development* 20, 461-472.

Walsh, D., Perez, C., Notary, J., and Mohr, I. (2005). Regulation of the translation initiation factor eIF4F by multiple mechanisms in human cytomegalovirus-infected cells. *Journal of virology* 79, 8057-8064.

Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D.R., and Proud, C.G. (2001). Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *The EMBO journal* 20, 4370-4379.

Ward, R.L., Knowlton, D.R., Greenberg, H.B., Schiff, G.M., and Bernstein, D.I. (1990). Serum-neutralizing antibody to VP4 and VP7 proteins in infants following vaccination with WC3 bovine rotavirus. *Journal of virology* 64, 2687-2691.



- Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G., and Cooper, J.A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *The EMBO journal* *16*, 1909-1920.
- Welnowska, E., Sanz, M.A., Redondo, N., and Carrasco, L. (2011). Translation of viral mRNA without active eIF2: the case of picornaviruses. *PLoS one* *6*, e22230.
- Wendel, H.G., Silva, R.L., Malina, A., Mills, J.R., Zhu, H., Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukunaga, R., Teruya-Feldstein, J., Pelletier, J., *et al.* (2007). Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes & development* *21*, 3232-3237.
- Wentz, M.J., Patton, J.T., and Ramig, R.F. (1996). The 3'-terminal consensus sequence of rotavirus mRNA is the minimal promoter of negative-strand RNA synthesis. *Journal of virology* *70*, 7833-7841.
- Werden, S.J., Barrett, J.W., Wang, G., Stanford, M.M., and McFadden, G. (2007). M-T5, the ankyrin repeat, host range protein of myxoma virus, activates Akt and can be functionally replaced by cellular PIKE-A. *Journal of virology* *81*, 2340-2348.
- White, J.P., Reineke, L.C., and Lloyd, R.E. (2011). Poliovirus switches to an eIF2-independent mode of translation during infection. *Journal of virology* *85*, 8884-8893.
- Willcocks, M.M., Carter, M.J., and Roberts, L.O. (2004). Cleavage of eukaryotic initiation factor eIF4G and inhibition of host-cell protein synthesis during feline calicivirus infection. *The Journal of general virology* *85*, 1125-1130.
- Willcocks, M.M., Locker, N., Gomwalk, Z., Royall, E., Bakhshesh, M., Belsham, G.J., Idamakanti, N., Burroughs, K.D., Reddy, P.S., Hallenbeck, P.L., *et al.* (2011). Structural features of the Seneca Valley virus internal ribosome entry site (IRES) element: a picornavirus with a pestivirus-like IRES. *Journal of virology* *85*, 4452-4461.
- Wilson, J.E., Powell, M.J., Hoover, S.E., and Sarnow, P. (2000). Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Molecular and cellular biology* *20*, 4990-4999.
- Wolf, M., Vo, P.T., and Greenberg, H.B. (2011). Rhesus rotavirus entry into a polarized epithelium is endocytosis dependent and involves sequential VP4 conformational changes. *Journal of virology* *85*, 2492-2503.
- Wullschlegel, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* *124*, 471-484.

## X

- Xiao, H., Xu, L.H., Yamada, Y., and Liu, D.X. (2008). Coronavirus spike protein inhibits host cell translation by interaction with eIF3f. *PLoS one* *3*, e1494.
- Xu, Z., Tuo, W., Clark, K.I., and Woode, G.N. (1996). A major rearrangement of the VP6 gene of a strain of rotavirus provides replication advantage. *Veterinary microbiology* *52*, 235-247.

## Y

- Yan, W., Frank, C.L., Korth, M.J., Sopher, B.L., Novoa, I., Ron, D., and Katze, M.G. (2002a). Control of PERK eIF2 $\alpha$  kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 15920-15925.
- Yan, W., Gale, M.J., Jr., Tan, S.L., and Katze, M.G. (2002b). Inactivation of the PKR protein kinase and stimulation of mRNA translation by the cellular co-chaperone P58(IPK) does not require J domain function. *Biochemistry* *41*, 4938-4945.
- Yang, A.D., Barro, M., Gorziglia, M.I., and Patton, J.T. (2004a). Translation enhancer in the 3'-untranslated region of rotavirus gene 6 mRNA promotes expression of the major capsid protein VP6. *Arch Virol* *149*, 303-321.
- Yang, H.S., Cho, M.H., Zakowicz, H., Hegamyer, G., Sonenberg, N., and Colburn, N.H. (2004b). A novel function of the MA-3 domains in transformation and translation suppressor Pdc4 is essential for its binding to eukaryotic translation initiation factor 4A. *Molecular and cellular biology* *24*, 3894-3906.
- Yanguez, E., Rodriguez, P., Goodfellow, I., and Nieto, A. (2012). Influenza virus polymerase confers independence of the cellular cap-binding factor eIF4E for viral mRNA translation. *Virology* *422*, 297-307.
- Yeager, M., Berriman, J.A., Baker, T.S., and Bellamy, A.R. (1994). Three-dimensional structure of the rotavirus haemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis. *The EMBO journal* *13*, 1011-1018.
- Yeager, M., Dryden, K.A., Olson, N.H., Greenberg, H.B., and Baker, T.S. (1990). Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *The Journal of cell biology* *110*, 2133-2144.
- Yoder, J.D., and Dormitzer, P.R. (2006). Alternative intermolecular contacts underlie the rotavirus VP5\* two- to three-fold rearrangement. *The EMBO journal* *25*, 1559-1568.
- Yoder, J.D., Trask, S.D., Vo, T.P., Binka, M., Feng, N., Harrison, S.C., Greenberg, H.B., and Dormitzer, P.R. (2009). VP5\* rearranges when rotavirus uncoats. *Journal of virology* *83*, 11372-11377.
- Yoshida, M., Yoshida, K., Kozlov, G., Lim, N.S., De Crescenzo, G., Pang, Z., Berlanga, J.J., Kahvejian, A., Gehring, K., Wing, S.S., *et al.* (2006). Poly(A) binding protein (PABP) homeostasis is mediated by the stability of its inhibitor, Paip2. *The EMBO journal* *25*, 1934-1944.
- Yutani, T., Tomoo, K., Ishida, T., Miyoshi, H., and Miura, K. (2000). Regulation of human eIF4E by 4E-BP1: binding analysis using surface plasmon resonance. *IUBMB life* *49*, 27-31.

Yu, Y., Abaeva, I.S., Marintchev, A., Pestova, T.V., and Hellen, C.U. (2011). Common conformational changes induced in type 2 picornavirus IRESs by cognate trans-acting factors. *Nucleic acids research* 39, 4851-4865.

Yu, Y., Kudchodkar, S.B., and Alwine, J.C. (2005). Effects of simian virus 40 large and small tumor antigens on mammalian target of rapamycin signaling: small tumor antigen mediates hypophosphorylation of eIF4E-binding protein 1 late in infection. *Journal of virology* 79, 6882-6889.

Yueh, A., and Schneider, R.J. (1996). Selective translation initiation by ribosome jumping in adenovirus-infected and heat-shocked cells. *Genes & development* 10, 1557-1567.

Yueh, A., and Schneider, R.J. (2000). Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S rRNA. *Genes & development* 14, 414-421.

Yun, B.G., Matts, J.A., and Matts, R.L. (2005). Interdomain interactions regulate the activation of the heme-regulated eIF 2 alpha kinase. *Biochimica et biophysica acta* 1725, 174-181.

## Z

Zaborowska, I., and Walsh, D. (2009). PI3K signaling regulates rapamycin-insensitive translation initiation complex formation in vaccinia virus-infected cells. *Journal of virology* 83, 3988-3992.

Zambrano, J.L., Diaz, Y., Pena, F., Vizzi, E., Ruiz, M.C., Michelangeli, F., Liprandi, F., and Ludert, J.E. (2008). Silencing of rotavirus NSP4 or VP7 expression reduces alterations in Ca<sup>2+</sup> homeostasis induced by infection of cultured cells. *Journal of virology* 82, 5815-5824.

Zarate, S., Espinosa, R., Romero, P., Guerrero, C.A., Arias, C.F., and Lopez, S. (2000a). Integrin alpha2beta1 mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology* 278, 50-54.

Zarate, S., Espinosa, R., Romero, P., Mendez, E., Arias, C.F., and Lopez, S. (2000b). The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *Journal of virology* 74, 593-599.

Zarate, S., Romero, P., Espinosa, R., Arias, C.F., and Lopez, S. (2004). VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin alphavbeta3 through a novel integrin-binding site. *Journal of virology* 78, 10839-10847.

Zeng, C.Q., Estes, M.K., Charpilienne, A., and Cohen, J. (1998). The N terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3. *Journal of virology* 72, 201-208.

Zeng, C.Q., Wentz, M.J., Cohen, J., Estes, M.K., and Ramig, R.F. (1996). Characterization and replicase activity of double-layered and single-layered rotavirus-like particles expressed from baculovirus recombinants. *Journal of virology* 70, 2736-2742.

Zhang, B., Morace, G., Gauss-Muller, V., and Kusov, Y. (2007). Poly(A) binding protein, C-terminally truncated by the hepatitis A virus proteinase 3C, inhibits viral translation. *Nucleic acids research* 35, 5975-5984.

Zhang, F., Moon, A., Childs, K., Goodbourn, S., and Dixon, L.K. (2010). The African swine fever virus DP71L protein recruits the protein phosphatase 1 catalytic subunit to dephosphorylate eIF2alpha and inhibits CHOP induction but is dispensable for these activities during virus infection. *Journal of virology* 84, 10681-10689.

Zhang, R., Jha, B.K., Ogden, K.M., Dong, B., Zhao, L., Elliott, R., Patton, J.T., Silverman, R.H., and Weiss, S.R. (2013). Homologous 2',5'-phosphodiesterases from disparate RNA viruses antagonize antiviral innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 13114-13119.

Zhouravleva, G., Frolova, L., Le Goff, X., Le Guellec, R., Inge-Vechtomov, S., Kisselev, L., and Philippe, M. (1995). Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *The EMBO journal* 14, 4065-4072.

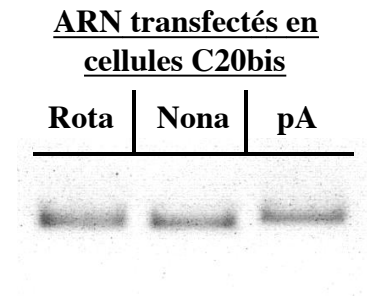
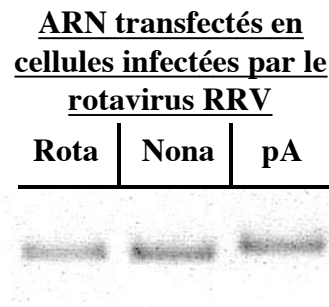
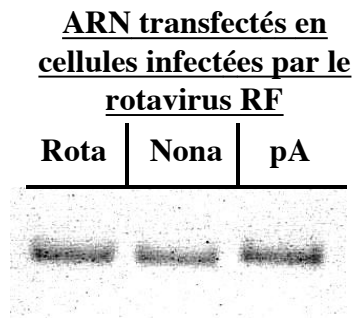
Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., and Hall, M.N. (2011). Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* 144, 757-768.

Zoncu, R., Efeyan, A., and Sabatini, D.M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature reviews* 12, 21-35.

# Annexes

**Annexe 1 : Vérification des ARN rapporteurs par gel d'agarose.** Les ARN sont vérifiés par dépôt en quantités égales (50ng/puit) dans un gel d'agarose 1% TBE ou TAE + BET.

## **I/ Rôle de la protéine NSP3 sur la traduction d'ARN de type rotavirus (p108).**



**Annexe 2 : Tableau regroupant les valeurs brutes des cycles seuils (Ct) observés en RT-qPCR.** Les moyennes des valeurs brutes des cycles seuils mesurés par RT-qPCR sont rassemblées dans les tableaux ci-dessous. Les valeurs sont présentées selon l'ARN rapporteur étudié (Rota, Nona ou poly(A)), le temps post-transfection (T0 ou T6) et le type de cellules (cellules infectées (I) ou non infectées (NI) ; Cellules MA104 ou C20bis)).

### 1/ Cycles seuils observés en RT-qPCR après électroporation en cellules infectées par le rotavirus de souche RF (p109).

Ct Rluc	Rota		Nona		poly(A)	
	T0	T6	T0	T6	T0	T6
<b>NI</b>	21,92	25,67	22,39	26,19	22,67	26,14
<b>I</b>	21,62	24,92	22,25	25,55	22,23	25,66

Ct GAPDH	Rota		Nona		poly(A)	
	T0	T6	T0	T6	T0	T6
<b>NI</b>	20,83	25,18	20,50	24,01	20,83	23,87
<b>I</b>	20,82	26,14	20,79	25,07	20,52	25,67

### 2/ Cycles seuils observés en RT-qPCR après électroporation en cellules infectées par le rotavirus de souche RRV (p109).

Ct Rluc	Rota		Nona		poly(A)	
	T0	T6	T0	T6	T0	T6
<b>NI</b>	22,24	25,99	22,86	26,81	22,73	26,58
<b>I</b>	22,04	25,81	22,67	26,56	22,83	26,07

Ct GAPDH	Rota		Nona		poly(A)	
	T0	T6	T0	T6	T0	T6
<b>NI</b>	21,47	25,46	21,38	25,57	21,25	25,37
<b>I</b>	21,14	26,50	21,21	26,36	21,42	26,41

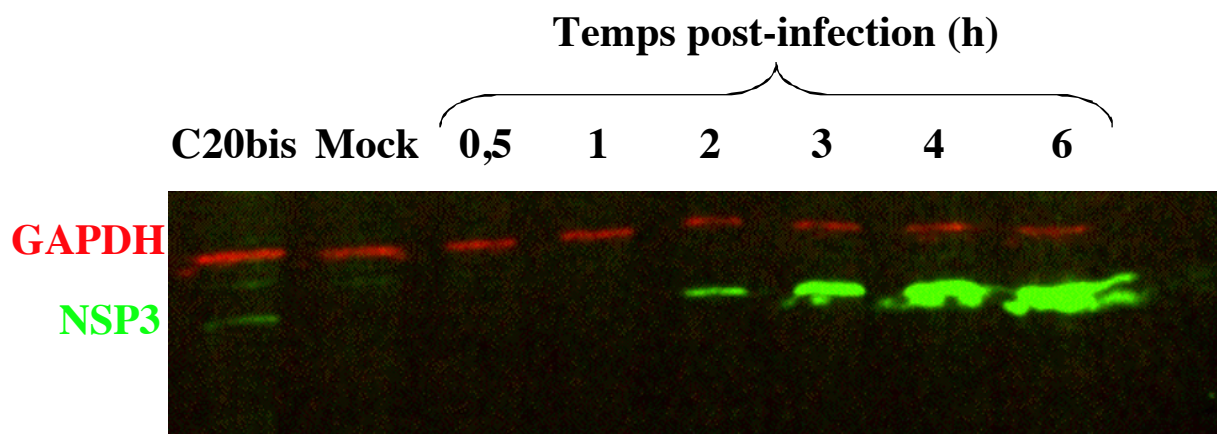
### 3/ Cycles seuils observés en RT-qPCR après électroporations dans les cellules C20bis (p112).

Ct Rluc	Rota		Nona		poly(A)	
	T0	T6	T0	T6	T0	T6
<b>MA104</b>	21,58	27,45	21,88	28,39	21,76	27,34
<b>C20</b>	21,94	28,37	21,71	28,17	21,86	28,54

Ct GAPDH	Rota		Nona		poly(A)	
	T0	T6	T0	T6	T0	T6
<b>MA104</b>	22,20	26,43	21,98	26,62	21,93	25,34
<b>C20</b>	22,29	25,58	22,09	25,63	22,09	26,25

### Annexe 3 : Vérification du niveau d'expression de la protéine NSP3 dans les cellules

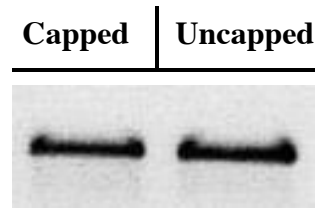
**C20bis.** L'expression de NSP3 a été vérifiée au sein de lysats de cellules C20bis ou de cellules MA104 non infectées ou infectées à différents temps par immunodétection. La protéine NSP3 est exprimée dans les cellules C20bis à un niveau équivalent à celui observé entre 1h et 2h d'infection en cellules MA104 à MOI de 10.



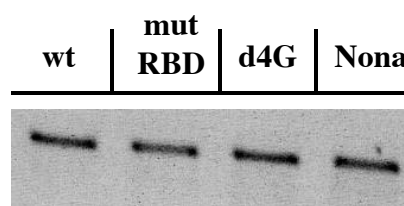
**Annexe 4 : Vérification des ARN rapporteurs par gel d'agarose.** Les ARN sont vérifiés par dépôt en quantités égales (50ng/puit) dans un gel d'agarose 1% TBE ou TAE + BET.

### 3/ Application du système « T2A » (p125)

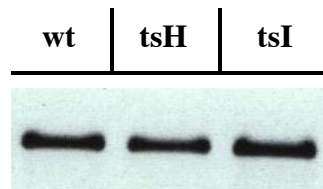
#### a/ Vérification de la dépendance à la coiffe de la traduction du gène codant NSP3 (p125)



#### b/ Rôle de la protéine NSP3 dans la traduction de son propre ARNm (p128)

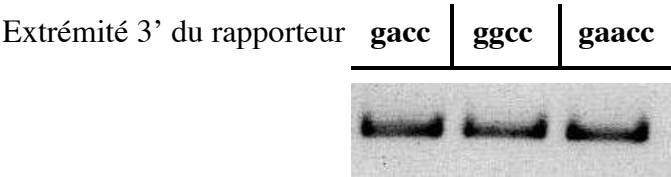


#### D/ Application du système T2A aux mutants thermosensibles de NSP3 (p132)

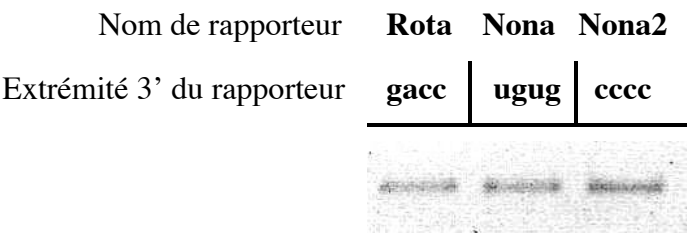


**Annexe 5 : Vérification des ARN rapporteurs par gel d'agarose.** Les ARN sont vérifiés par dépôt en quantités égales (50ng/puit) dans un gel d'agarose 1% TBE ou TAE + BET.

*1/ Effet des extrémités GACC, GGCC ou GAACC sur la traduction des ARN « Rota » en présence de NSP3 des souches RF, RRV ou SA11 (p134).*



*2/ Effet d'une extrémité 3' non reconnue pas NSP3 sur la traduction de l'ARN (p136).*



**Annexe 6 : Séquences des 5' et 3' UTR contenues dans les ARN rapporteurs. (A)** Les différentes 5' UTR sont listées avec les nucléotides favorables (en bleu) ou défavorables (en rouge) à la reconnaissance du codon d'initiation (p175 et 178). **(B)** Les différentes 3' UTR sont listées. La 3' UTR de gène 4 a été soit raccourcie (vert et orange), soit la séquence a été désordonnée (en bleu), puis raccourcie et remaniée (en violet) de manière à obtenir une structure d'ARN secondaire en 3' prédite « ouverte » par le serveur mFold (p179 et 180).

A

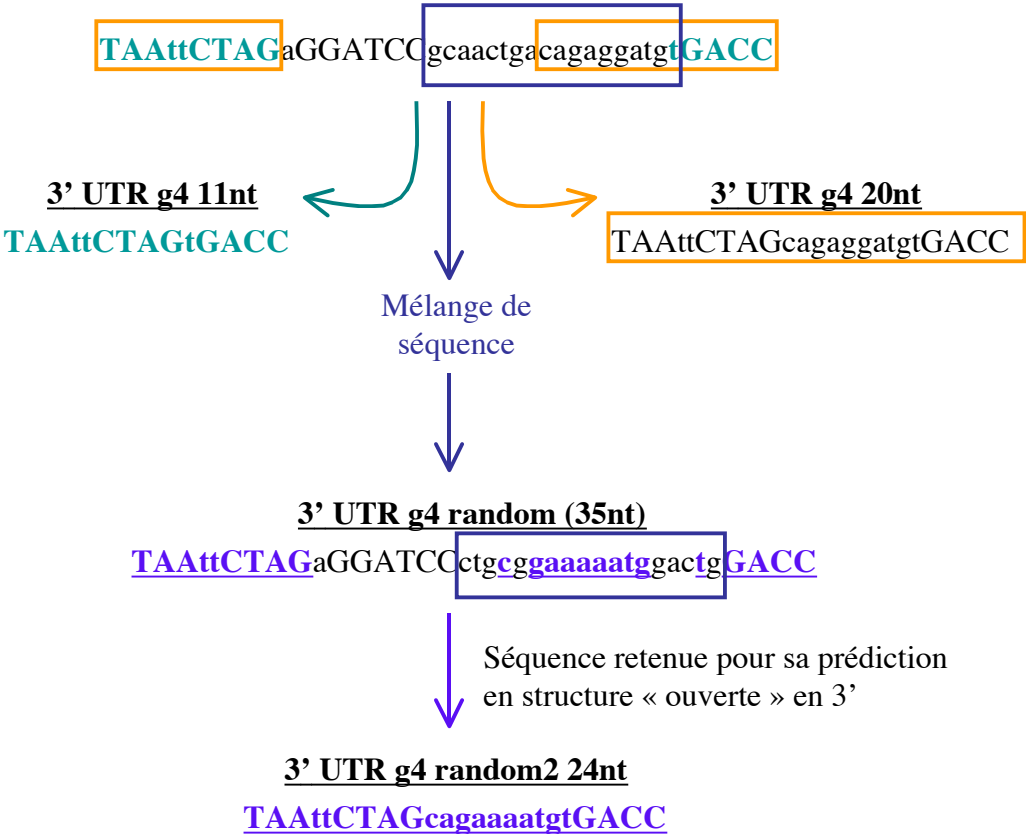
Type de 5' UTR	Séquences des 5' UTR
5' UTR g11 (22nt)	GGCTTTAAAGCGCTACAGT <b>GCC</b> <u>ATG</u> <b>GCT</b>
5' UTR g4 (9nt)	GGCTAT <b>AAA</b> <u>ATG</u> <b>GCT</b>
5' UTR g4 STOP (9nt)	GGCTAT <b>AAA</b> <u>TAG</u> <b>GCT</b>
5' UTR g4 5nt	GG <b>CAA</b> <u>ATG</u> <b>GCT</b>
5' UTR g4 2nt	GG <u>ATG</u> <b>GCT</b>
5' UTR g4 partial kozak	GGCTAT <b>AAA</b> <u>ATG</u> <b>TCT</b>
5' UTR g4 bad kozak	GGCTAT <b>CAA</b> <u>ATG</u> <b>TCT</b>
5' UTR g4 5nt bad kozak	GG <b>CAA</b> <u>ATG</u> <b>TCT</b>

B

**3' UTR g6 (155nt)**

TAA**tt**CTAGaGGATCCt**gaggaccaagctaaccacttgg**tatccgactt**gtg**agtatgtagctacgtcaagctgtttgaactctgtaagtaaggatgcgtctacgtattcgctacacagagtaatcactcagatggcgtagt**gagaggatgt**GACC

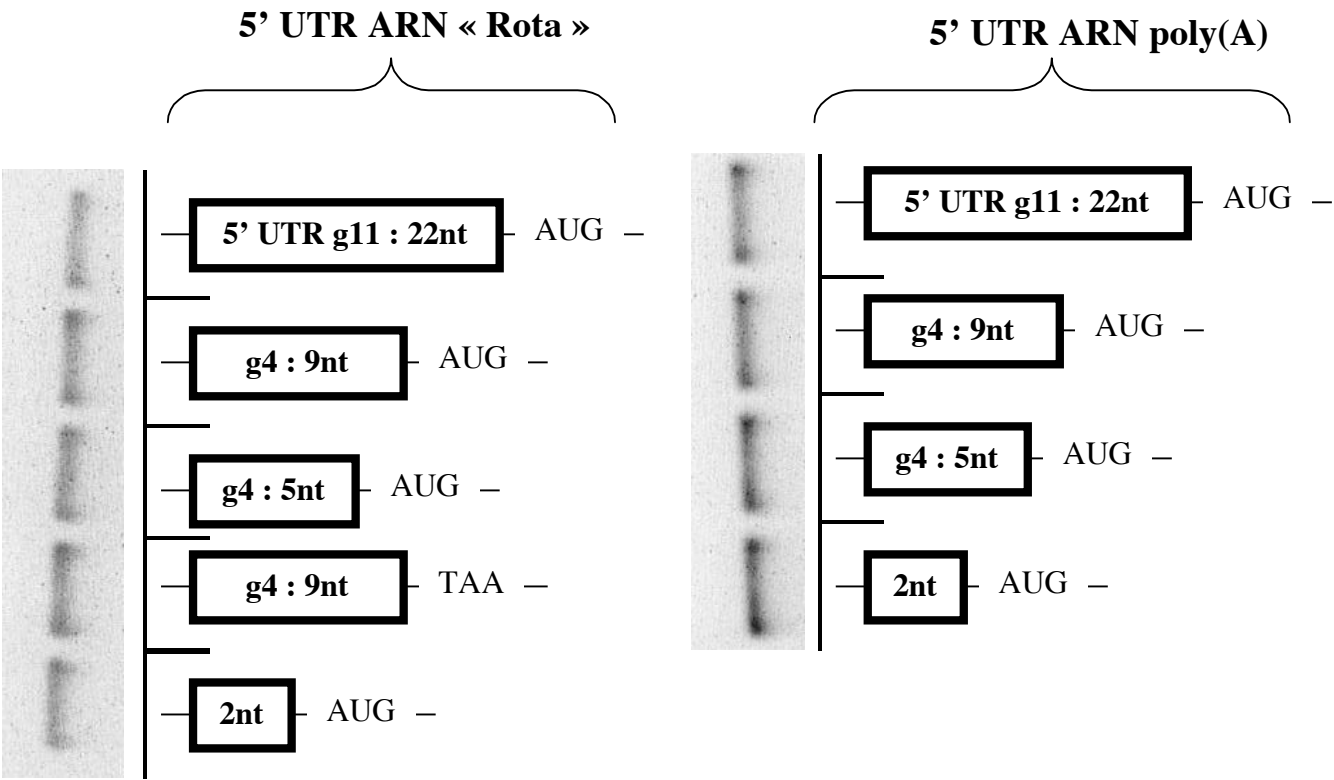
**3' UTR g4 (35nt)**



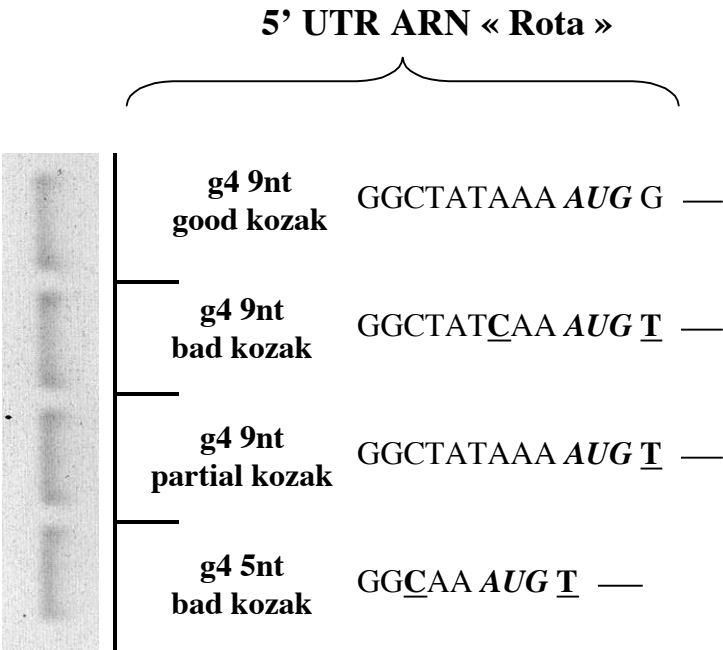


**Annexe 7 : Vérification des ARN rapporteurs par gel d'agarose.** Les ARN sont vérifiés par dépôt en quantités égales (50ng/puit) dans un gel d'agarose 1% TBE ou TAE + BET.

*1/ Effet du 5'UTR sur la traduction d'ARN Rota ou poly(A) (p137).*

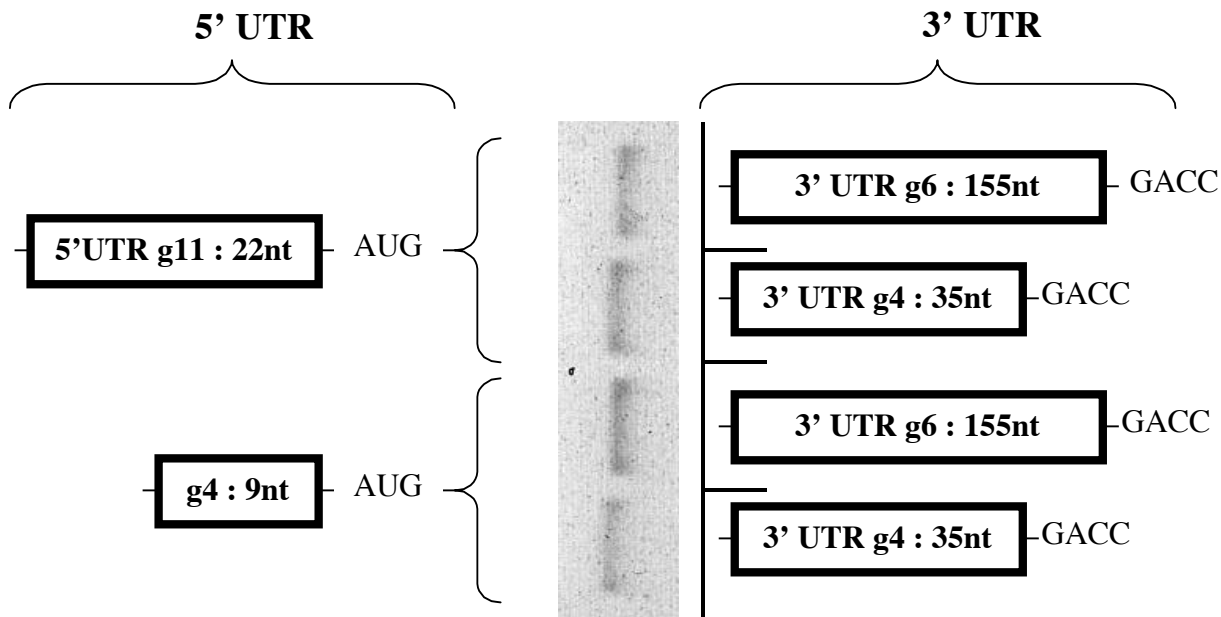


*1/ Effet du 5'UTR sur la traduction d'ARN Rota ou poly(A) (p137).*

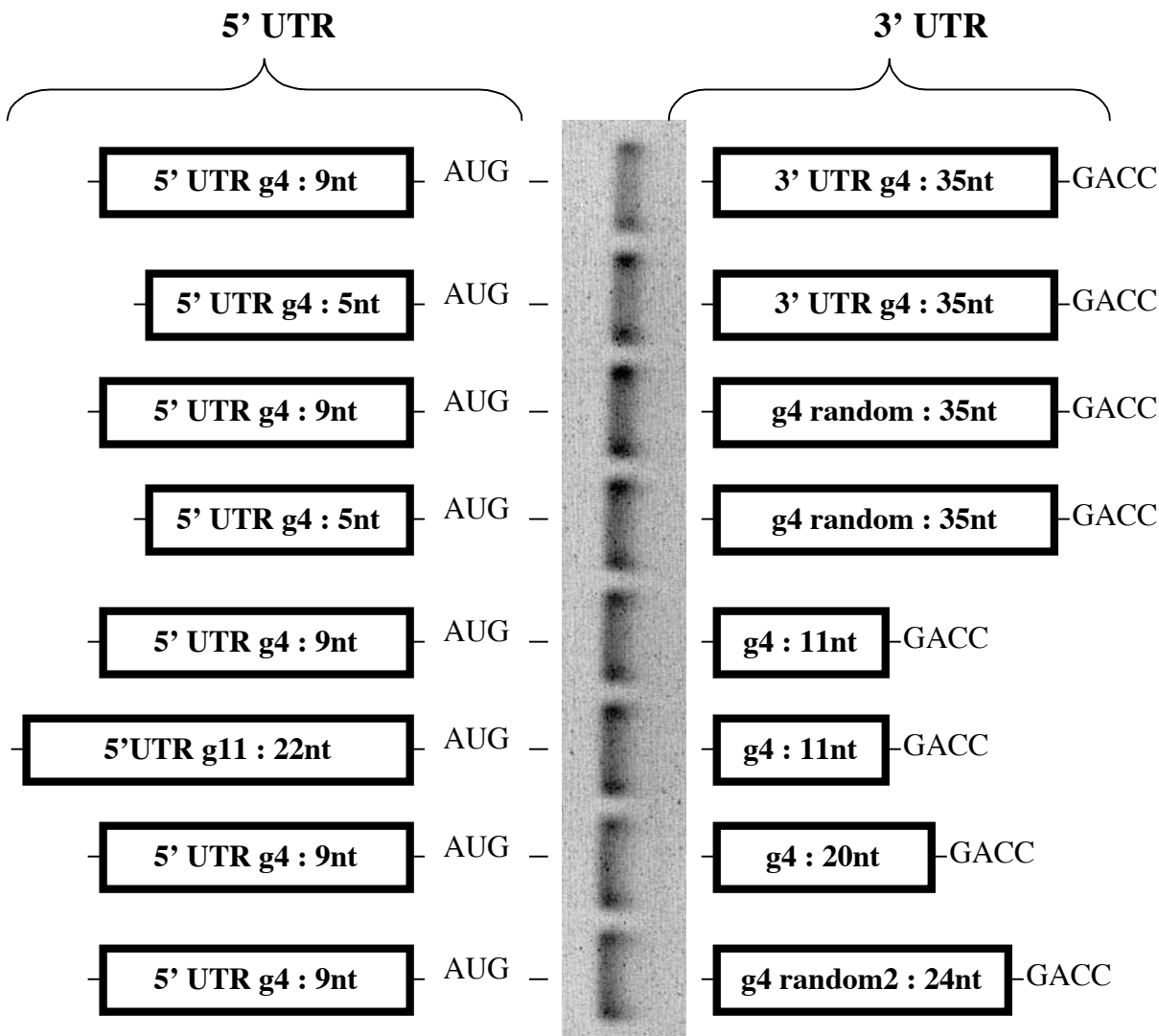


**Annexe 8 : Vérification des ARN rapporteurs par gel d'agarose.** Les ARN sont vérifiés par dépôt en quantités égales (50ng/puit) dans un gel d'agarose 1% TBE ou TAE + BET.

*2/ Effet du 3' UTR sur la traduction d'ARN Rota (p141)*  
*a/ Substitution du 3' UTR de gène 6 par la 3' UTR de gène 4 (p141).*



*b/ Effet du 3' UTR sur la traduction dépendante de NSP3 (p142).*





Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)

Virus Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/virusres](http://www.elsevier.com/locate/virusres)



# Identification of mutations in the genome of rotavirus SA11 temperature-sensitive mutants D, H, I and J by whole genome sequences analysis and assignment of tsI to gene 7 encoding NSP3<sup>☆</sup>

Patrice Vende<sup>a</sup>, Matthieu Gratia<sup>a</sup>, Mariela D. Duarte<sup>a,b</sup>, Annie Charpilienne<sup>a</sup>,  
Matthieu Saguy<sup>a,1</sup>, Didier Poncet<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Virologie Moléculaire et Structurale, CNRS UPR 3296, INRA USC 1358, IFR 115, Centre de Recherche de Gif, 1 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette, France

<sup>b</sup> Université d'Evry Val d'Essonne, Département de Biologie, 91025 Evry Cedex, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 27 February 2013

Received in revised form 22 May 2013

Accepted 27 May 2013

Available online xxx

### Keywords:

Rotavirus

Temperature-sensitive

Mutation

Sequencing

NSP3

## ABSTRACT

The complete coding sequences of the four unassigned temperature-sensitive (ts) Baylor prototype rotavirus mutants (SA11ts D, H, I and J) were sequenced by deep sequencing double-stranded RNA using RNA-seq. Non-silent mutations were assigned to a specific mutant by Sanger sequencing RT-PCR products from each mutant. Mutations that led to amino acid changes were found in all genes except for genes 1 (VP1), 10 (NSP4) and 11 (NSP5/6). Based on these sequence analyses and earlier genetic analyses, the ts mutations in gene 7, which encodes the protein NSP3, were assigned to ts mutant groups I and H, and confirmed by an in vitro RNA-binding assay with recombinant proteins. In addition, ts mutations in gene 6 were assigned to tsJ. The presence of non-conservative mutations in two genes of two mutants (genes 4 and 2 in tsD and genes 3 and 7 in tsH) underscores the necessity of sequencing the whole genome of each rotavirus ts mutant prototype.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Rotavirus is the leading cause of severe gastroenteritis and dehydrating diarrhea in infants and children less than 5 years of age. Group A rotavirus infections result in approximately 453,000 deaths annually (Tate et al., 2012). Six of the twelve proteins encoded by the rotavirus genome are non-structural (NSP1–6). The roles of several of these non-structural proteins are not well defined, partly because of our long-standing inability to re-introduce targeted mutations into the rotavirus genome. Several reverse genetics techniques have been developed for the *Reoviridae* (Taniguchi and Komoto, 2012) family. In the case of rotavirus, the most efficient reverse genetics system uses a temperature-sensitive (ts) rotavirus mutant as a helper virus coupled with selective pressure provided by RNA interference (Trask et al., 2010).

The segmented, double-stranded (ds) RNA genome of rotavirus can undergo genetic reassortment (Ramig, 1997). After mixed infection, a genetically encoded phenotype can be mapped to a specific gene by tracking the phenotype as the trait segregates into the virus progeny and analyzing the segregation of parental genes in the individual progeny. A number of SA11 temperature-sensitive (ts) mutants were selected following chemical mutagenesis (Ramig, 1982, 1983; Ramig and Petrie, 1984). These mutants (now called “Baylor SA11ts”) were distributed into 10 groups by segregation analysis; mutants unable to yield temperature-resistant progeny after co-infection with another ts mutant at the permissive temperature (31 °C) were assigned to the same reassortment group, whereas pairs of mutants that yielded temperature-resistant progeny were assigned to different reassortment groups. Segregation analysis has also been reported for the mutant prototypes of each Baylor SA11 group after mixed infection at the non-permissive temperature (Ramig, 1983), but the results were not considered for genetic assignment. Then, the mutation of a representative member from each group was mapped to an individual gene by segregation analysis after mixed infection with wild type virus. This genetic analysis allowed six of the Baylor SA11 prototype mutants representing reassortment groups A, B, C, E, F and G to be assigned to genes 4, 3, 1, 8, 2 and 6, respectively (Gombold et al., 1985; Gombold and Ramig, 1987; Mansell et al., 1994). Four out of the five genes encoding non-structural

<sup>☆</sup> The partial nucleotide sequences of gene 7 from SA11 mutants H and I have been deposited in GenBank with the accession numbers JQ687099 and JQ687100, respectively. The sequences of gene 5 in SA11 mutants J, H and I, have been deposited in GenBank with the accession numbers JX417180, JX417181 and JX417182, respectively.

\* Corresponding author. Tel.: +33 0169 823 835; fax: +33 0169 824 308.

E-mail address: [didier.poncet@vms.cnrs-gif.fr](mailto:didier.poncet@vms.cnrs-gif.fr) (D. Poncet).

<sup>1</sup> Present address: Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris Sud, 91405 Orsay Cedex, France.

proteins remained unassigned (gene 5, NSP1; gene 7, NSP3; gene 10, NSP4; and gene 11, NSP5/6), and four of the Baylor SA11 reassortment groups (D, H, I and J) remained unmapped. Recently, the collection of Baylor SA11 ts mutants was matched with the NIH-SA11 and NIH-RRV collections of ts mutants (Criglar et al., 2011). Eleven groups were established, and reassortment mapping allowed some mutant groups to be assigned a gene. Reassortment group D (represented by RRVtsD(7)) was assigned to gene 5 (NSP1), and reassortment group J (represented by RRVtsJ(5)) was assigned to gene 11. Because mutant group H was assigned to gene 7 (NSP3) on the basis of our partial sequencing results, mutant I was tentatively assigned to gene 10 by the process of elimination; however, no mutations were detected by sequencing of this gene (Criglar et al., 2011).

To identify ts mutations in rotavirus genes encoding non-structural proteins, we used a reverse approach. First, we sequenced the whole genomes of the four Baylor SA11 ts mutants D, H, I and J by using Next-Generation Sequencing (RNA-seq) of dsRNA. Then, we analyzed the possible consequences of the mutation on protein functionality by introducing the mutations into the 3D structure of the viral protein (when known). Based on previous genetic analyses, this procedure has allowed us to identify mutations that are likely the cause of the thermosensitive phenotype of each mutant. For the tsI and tsH mutants, ts mutations in NSP3 were confirmed by a biochemical test.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Viruses and dsRNA extraction

The Baylor collection of SA11 rotavirus ts mutant strains was obtained from Dr. F. Ramig (Houston, TX). The mutant prototypes D (975), H (2384), I (2403) and J (2131) were propagated at low MOI at 31 °C on MA104 cells as described previously (Harb et al., 2008). The virus stocks used for amplification had been titrated at 39 and 31 °C by Dr. F. Ramig; all titers at 31 °C were  $>3.10^8$  pfu/ml, and the efficiency of plating (EOP = titer at 39 °C/titer at 31 °C) was  $<9.9 \times 10^{-5}$  for tsD,  $<8.47 \times 10^{-4}$  for tsH,  $<2.13 \times 10^{-4}$  for tsI and  $<1.23 \times 10^{-6}$  for tsJ.

Five hundred microliters of supernatant from infected cells were treated with 200 units of benzonuclease (Merck) for 30 min at 37 °C to remove any nucleic acids present in the culture medium. The supernatant was then adjusted to 20 mM EGTA to remove the rotavirus outer shell (Cohen et al., 1979). Double-layered particles were then pelleted ( $100,000 \times g$  in a Beckman Optimax LE, TLA100 rotor for 20 min). RNA was extracted from the pellet using the QIAquick RNA extraction kit (Macherey-Nagel) and quantified by UV absorption at 260 nm using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer.

### 2.2. Deep sequencing by RNA-seq

Whole genome sequences were obtained by using RNA-seq on the isolated dsRNA. Because multiplexing was not yet available on our sequencing platform, equal quantities of dsRNA from each mutant were mixed, and the resulting mixture was sequenced. The strand-specific RNA-seq template library was prepared from the total, pooled dsRNA-enriched sample (50 ng) according to the directional mRNA-seq library preparation protocol provided by Illumina (Levin et al., 2010). This protocol involves utilizing the small RNA sample prep kit and the mRNA-seq library prep kit. RNAs were randomly fragmented using a  $ZnCl_2$  based-fragmentation buffer, purified and treated with phosphatase and kinase before ligation of RNA adapters to the 5' and 3' ends. RNA treatment with  $Zn^{2+}$  yields fragments that contain a 5' OH and a 3' phosphate.

Phosphatase treatment removes the 3' phosphate, and kinase adds a 5' phosphate, thus yielding ligation-competent RNA fragments. The use of different adapters (v1.5 sRNA 3' and SRA 5' adaptors) allowed for subsequent orientation of the sequencing reads. The ligated RNA fragments were then reverse transcribed and amplified by PCR. The library was sequenced (36 bp single-read sequencing) with an Illumina Genome Analyzer IIx.

### 2.3. Whole genome sequence analysis

Short, 36-nucleotide-long sequencing reads were aligned to the SA11 rotavirus strain genome (accession numbers for the reference cDNAs used are indicated in Table 1, average base coverages per gene are indicated in Table 2, and the base coverage of each nucleotide is shown for each gene in Table S1). A list of all bases at each position (called 'BaCON score' according to their frequency and sequence quality score) was obtained with Casava 2.0 software (Table S1). In some cases (genes 1 and 5), the reads were aligned with other reference sequences using GSNAP (Wu and Nacu, 2010) and Sequencher 5.0 (Gene Codes Corp.) software. The alignments were visualized using the Tablet program (Milne et al., 2010).

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.05.018>.

### 2.4. RT-PCR

The entire open reading frames of genes 5, 7, 10 and 11 for each mutant were reverse transcribed and amplified using primers that recognize the 5' and 3' non-coding sequences (Table 1). The DNA sequences of both strands of the PCR fragments were obtained by dye terminator sequencing (GATC Biotech) with the PCR primers and aligned to the reference sequences using Sequencher 5.0. Internal primers were also used for gene 5 (Table 1).

Regions containing non-silent mutations were amplified by RT-PCR of 500 ng of dsRNA from each mutant and then sequenced. PCR of templates shorter than 300 bp was conducted on randomly primed RT products with specific primers flanking the mutations. PCR of templates longer than 300 bp was conducted on gene-specific primed RT products with the same primers that were used for RT-PCR. PCR primers flanking the mutations were selected using the online software program Primer 3 (Rozen and Skaletsky, 1993).

To sequence the 3' end of gene 3, dsRNAs from mutants D, H, I and J were polyadenylated using *E. coli* poly(A) polymerase (New England Biolabs) and ATP. Polyadenylated RNA was purified by hybridization to oligo(dT) bound to streptavidin that was coupled to magnetic beads (Ademtech). Reverse transcription was primed by binding UAP oligonucleotide to denatured RNA. PCR was then conducted using Taq DNA polymerase, the UAP oligonucleotide and SA2040F24g03 from SA11 gene 3 (Table 1).

### 2.5. Expression and purification of recombinant proteins

The RNA-binding domain of wt NSP3 SA11 (amino acid 4–168) was amplified by RT-PCR using oligos NSP3-SA11-BamHI and NSP3-EcoRI (Table 1) and cloned in-frame with the GST in pGex6P1 as an EcoRI-BamHI fragment. The tsH and tsI mutations (Gly131-Arg and Ala95-Gly) were then introduced by site-directed mutagenesis using oligonucleotides 710050 and 710051 (tsH) and 700052 and 700053 (tsI) (Table 1). The complete NSP3 genes were then re-sequenced to confirm that only the desired mutations were present. GST-fusion proteins were expressed at 18 °C in Arctic-Express *E. coli* cells and purified by affinity purification using glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare). The GST tag was removed from the GST-fused proteins using PreScission protease (GE Healthcare), and rNSP3 4–168 was further purified by affinity purification using a heparin column as described previously (Deo

**Table 1**

Oligonucleotides used for PCR, sequencing or mutagenesis in this study.

GENES	Reference sequence	Forward oligo	Positions	Reverse oligo	Positions	PCR amplicon length	Used for
GENE 01	JF896465	SA013118.1.F:ACGCTGACAGTATGTTGGA	2930–2949	SA013118.1.R:CGTTCTAATCTTGAAGAAGTTCG	3266–3289	360	RT-PCR 3118–3238
GENE 02	L33364	G02F598:AATGGCATGCATAACAATGAA	1693–1713	G02R598:AGTTATAATTGCAACTGCGTCA	1879–1900	208	RT-PCR 598
GENE 03	X16062	SA02.2.F654:CCAGAACAGCAAAGAAACAAAC	359–381	SA02.2.R654:TCTTGTAGCAAGTTTGGTCTGA	918–939	582	RT-PCR 1809
		G03D1004:GATCGGATCTGCTCCATCTT	901–920	G03R1004:TTTGTCTTCTACTGCTTTCTCCA	1106–1130	230	RT-PCR 1004
		G03D339.429: GCTGCAATTGCTTTACAATCAC	233–254	G03R339.429:TTTGGAGTCCAACGCTTCT	529–548	316	RT-PCR 339–429
		SA2040F24g03:AATTTGCTACATTGCAGGATGACT	2040–2063				3' end PCR
		SA112290F21g03seq:AATGGATATTACGACCAGTTA	2290–2310				3' end sequencing
GENE 04	D16346	DT AP-BIOT:GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTT					3' end, reverse transcription
		UAP:GTACTAGTCACGGCGTGGCC					3' end PCR (with UAP)
		SA04.F1154:GCCAGCGAATTATCAATACACA	900–921	SA04.R1438:ATTGATGATGCTGCGTCTGA	1714–1733	833	RT-PCR 1020–1628
GENE 05	AF290881	SA04.F65:TTGGCTTCGCTCATTTATAGACA	11–32	SA04.R65:TGCATATAATTTCCGACTGGA	487–507	497	RT-PCR 65
		SAF05 TGAAAAGTCTTGTTAGC	11–29	SAR05:AGTCTGGACGGTCTTGTGA	1562–1580	1570	Whole ORF amplification
GENE 06	L33365	SA05P800 GGAGAGATGAATTGGAGC	797–814	SA05M800:GCTCCAATTCATCTCTCC	797–814		Sequencing
		G06D55:GAAGTCTTCAACATGGATGTCCT	12–34	G06R55:TTGTATTCTTGCCGTTTCAA	256–276	265	RT-PCR 60–186
		G06D309:CACTTATCAAGCAAGATTGGAA	836–856	G06R309:TTGCGTACTCTTGCCTAACG	1067–1086	251	RT-PCR 948–1052
		G06D385:TTATGTTGAAACGGCAAGAAA	251–271	G06R385:TTATCATGAGCGGGTTGTGA	528–547	297	RT-PCR 385
GENE 07	AY065843	DIRSARR7: GATTAGGCGGCCGCTAATACG	1–19	ArevSARR7:GATTAGTACCGGGTCTCCG	1085–1105	1155	Whole ORF amplification
		ACTCACTATAGGCTTTTAAATGCTTTTCAG		GTACACATAACGCCCTATAG			
		NSP3 SA11 BamHI	35–45	NSP3 SA11 EcoRI GGCCTTTGAATTCATTTTTCATCCAC	500–511		Cloning pGex6P1
		GTATTTTCAGGGATCCATGGAGTCTAC					
		710050 GTAAAAGAAATACCTaGgAAATCATCATCTA	401–431	710051 TAGATGATGATTcCtAGGTATTCTTTTAC	401–431		Mutation H
GENE 09	V01546	710052 TACTTCTAGAGCAGgTAAATGGGATGAGG	295–323	710053 CCTCATCCAATTaCtGCTCTAGAAGTA	295–323		Mutation I
		SA09F64 GGCTAGCGGTTAGCTCCTTT	27–46	SA09R64 ATTTCAAGTCGACGCTCAGT	307–326	300	RT-PCR 186–238
GENE 10	K01138	F10 ATAAGAATCGGCGGCTAATACGACTCACTATAG-GCTTTTAAAGTTCTGTTT	1–21	R10 ATAGTTTAAACCGGTCACATTAAGACCGTTCC	732–751	794	Whole ORF amplification
GENE 11	M28347	F11 ATAAGAATCGGCGGCTAATACGACTCACTATAG-GCTTTAAAGCGCTACAGTG	1–21	R11 ATAGTTTAAACCGGTCACAAAACGGGAGTGGG	647–667	712	Whole ORF amplification

For each gene, the table indicates the nucleotidic (5'–3') sequence of the oligonucleotide primers used for RT-PCR (forward and reverse oligos) with their positions on the nucleotide reference sequences, the length of the PCR amplicon obtained, and the position of the mutations detected by deep sequencing and targeted with the primers by RT-PCR. Oligonucleotides used for sequencing, cloning and site directed mutagenesis are also indicated.



**Table 2**  
RNA-seq reads distribution per rotavirus and human 18 and 28S ribosomal genes.

Gene: ref seq	Number of reads (1)	Gene length	Average base coverage	Coverage on 5'G	Coverage on 3'C	Smallest coverage of nt in ORF
1: JF895465	114,542	3302	1097	30	3	23
2: L33364	953,199	2693	11,104	465	0	17
3: X16062	927,827	2591	11,423	8	41	57
4: D16346	82,389	2362	1107	5	104	33
5: AF290881	890,160	1614	17,571	2	15	160
6: L33365	189,894	1356	4450	13	4	51
7: AY065843	78,039	1105	2237	5	3	226
8: L04532	65,748	1058	2141	4	2	73
9: V01546	105,815	1062	3266	44	130	279
10: DQ838625	396,663	751	16,597	24	17	246
11: M28347	73,890	667	3510	13	2	437
Total rota	3,878,166	18,561				
H18S:X03205	2,996,349	1869				
H28S:NR003287	11,272,243	5070				
Total H ribo	14,268,592					

The table indicates for each rotavirus gene, 18S and 28S human ribosomal RNAs, the total number of reads aligned to the reference (ref. seq.) sequence using GSNAP. Out of the 24,772,249 total reads obtained, 6,625,491 remaining reads correspond to reads mapped on cellular mRNAs, ribosomal 5S and not uniquely mapped reads (1) using GSNAP.

The average coverage per nucleotides the coverage of the first 5' (G) or last 3' (C) nucleotides, and the smallest coverage for one position (last four columns, light gray) were deduced from the CASAVA analysis presented in Table S1.

et al., 2002). The purified proteins were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in 5 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, and 10% glycerol.

## 2.6. RNA-binding assays

Two micrograms of a 5' biotinylated synthetic RNA representing the 3' end of a rotavirus mRNA that interacts with NSP3 (GUUAU-GUGACC; Metabion) was bound to NeutrAvidin-UltraLink beads (10  $\mu\text{l}$  of settled resin) in 5 mM HEPES pH 7.5 and 150 mM NaCl (incubation buffer). Purified, pre-warmed (20 or  $40^{\circ}\text{C}$ ) recombinant proteins (500 ng) were incubated for 2 h at 20 or  $40^{\circ}\text{C}$  with the beads (incubation buffer contained 5  $\mu\text{g}$  of BSA and 0.5% Triton X-100 in a final volume of 700  $\mu\text{l}$ ) and then washed 3 times with 700  $\mu\text{l}$  of incubation buffer containing 0.1% Triton X-100. Washes were performed with buffer warmed to the temperatures used for incubation. The bound proteins were recovered in Laemmli buffer and analyzed by SDS-PAGE, followed by immunoblotting using an anti-NSP3 (4–150) rabbit polyclonal antibody and near-infrared fluorescent secondary antibodies (Dyelight 800, Perbio). Western blots were visualized using an OdysseyFC imager and quantified using Image Studio software (LI-COR).

## 3. Results

### 3.1. Sequencing and sequence analysis strategies

Our strategy was to sequence the whole genome of four D, H, I and J Baylor SA11 ts mutants by deep sequencing dsRNA from a mixture of the four mutants and then to confirm and attribute the mutations to a specific mutant by classical sequencing of the RT-PCR products amplified from the region of interest of each individual mutant RNA.

We sequenced the whole genomes of the D, H, I and J ts prototypes by RNA-seq of dsRNA extracted from the supernatants of infected cells. The reads were mapped to SA11 reference sequences (Table 2), and the frequency of mutation for each nucleotide position, as well as the sequencing quality score, was reported (Table S1). Deep sequencing produced 24,772,249 36-nucleotide-long reads, of which 15% (3.9 million) mapped to the rotavirus genome (Table 2). On average, the entire ORF of each gene was covered several hundred times; the lowest number of reads (17) for one base occurred in the gene 2 ORF (Table 2).

Because dsRNA from the different mutants was mixed in equal amounts, a mutation present in only one mutant should represent approximately 25% of the reads. To avoid missing important mutations, mutations found at frequencies greater than 5% with sequencing quality scores (BaCON score) greater than 50 were considered (Table 3). Then, mutations that led to a change in an amino acid were further confirmed by individual RT-PCR on dsRNA from each ts mutant, followed by classical sequencing of the PCR products. Thus, each amino acid mutation detected by deep sequencing could be assigned to a particular ts mutant (Table 3). The results of these analyses show that the selection criteria used were judicious because mutations with a frequency above 5% or with a good quality score, such as gene 1 mutations 3118 and 3238, gene 10 mutation 416 or gene 7 mutation 913, were not detected by sequencing the corresponding RT-PCR products (Table 3). Hence, according to the selection criteria that we used (>5%), true mutations should not have been excluded.

### 3.2. Analysis of mutations (Table 3)

The damaging effect that a mutation will have on a protein cannot be accurately predicted; moreover, the effect of a  $31^{\circ}\text{C}$  to  $37^{\circ}\text{C}$  temperature change on the function of a mutant protein cannot be easily determined. However, the importance of the amino acid changes, the knowledge of the function of the protein, the protein's three-dimensional structure and genetic diversity may allow for better identification of interesting mutations. In the following sections, we will analyze each mutation in light of what is known about these proteins independently of the genetic analysis. Then, in the discussion section, we will show how our analysis fits with the reassortment analysis performed previously on the Baylor SA11 ts mutants H, I and J. The mutations will be qualified according to the Blosom62 matrix (Block Substitution Matrix) for amino acid substitutions (Henikoff and Henikoff, 1992), which is the most commonly used matrix and is used by Blast algorithms to score alignments between evolutionarily divergent protein sequences. A positive score is given to more likely substitutions, while a negative score is given to less likely substitutions. Changes will be qualified as "conservative" for strictly positive coefficients in the substitution matrix, as "neutral" for null coefficients and as "non-conservative" for negative values. Note that mutations that led to the replacement of one amino acid with a biochemically similar amino acid correspond to a null or positive coefficient and that similar results

**Table 3**

Whole genome sequence analysis of SA11 ts mutants D, H, I and J.

Gene/ protein GenBank	Nuc. pos.	Aa. pos.	wt base	Mutation	% mutation	BaCON score wt:mut	ts mutant				aa change	Blosun	Comments
							D	H	I	J			
1/VP1	321		C	T	27	13550.89:5051.24					Silent		
X16830	2616		C	C	37	500.08:290.08					Silent		
JF896465	3118	1034	C	T	16	234.70:43.40					His1034-Tyr		Not confirmed
	3141		T	C	25	806.63:265.69		+			Silent		
	3177		C	T	44	1436.84:1138.36				+	Silent		
	3238	1074	A	T	9	1305.94:125.32					Thr1074-Ser		Not confirmed
2/VP2	654	213	T	C	14	2167.03:345.57	+				Ile213-Thr	-1	
L33364	1809	598			9	678.91:45.10					Ser598-Asn		Not confirmed
3/VP3	339	97	A	G	17	85672.62:17731.36		+			Tyr97-Cys	-2	
X16062	429	127	T	C	24	42891.70:13342.61	+				Val127-Ala	0	
	1004	319	C	A	31	14489.96:6501.88				+	His319-Asn	1	
	1336	429	G	A	5	1856.29:88.00					Silent		
	2305	752	C	T	37	7799.94:4567.79					Silent		
	2460	804	A	G	18	24001.87:5095.29		+			Asn804-Ser	1	
	2589		A	G	29	268.18:107.70					Non-coding		Not confirmed
4/VP4	65	19	C	G	31	3851.84:1726.65	+				Ser19-Cys	-1	
D16346	1020		A	A	6	739.18:47.50							Not confirmed
	1154	382	C	C	18	568.38:127.60				+	Gly382-Ala	0	
	1438	477	A	G	19	784.54:180.78			+		Asn477-Asp	1	Ser in JX274502
	1467	486	C	T	37	938.95:556.99	+				Silent		
	1627	540	G	T	7	559.37:39.55					Ala540-Ser		Not confirmed
	1628	540	C	T	12	471.55:64.89					Ala540-Val		Not confirmed
5/NSP1	1457	476	A	G	25	26959.72:8923.96			+		Asn476-Ser	1	EU513170/71
AF290881	1527		C	A,T	5 A,6T	637.65:6.70					Non-coding	Deletion	SA114F (AF290883)
	1529		T	A	9	756.16:76.20		+	+	+	Non-coding	1527–1530	SA114F (AF290883)
6/VP6	60	13	G	C	15	3144.28:564.36			+		Asp13-His	-1	SA11 tsG L15384
L33365	186	55	C	A	27	12159.94:4479.49			+		Pro55-Thr	-1	
	305		T	C	21	24559.65:6334.78			+		Silent		
	385	121	C	G	27	8485.66:3077.79				+	Ala121-Gly	0	SA11 tsG L15384
	572		C	T	13	1178.96:175.29					Silent		
	785		C	G	26	7049.76:2409.50					Silent		
	948	309	C	G	24	773.85:239.99			+		Pro309-Ala	-1	
	1052		A	G	18	988.75:228.90			+		Silent		
7/NSP3	309	95	C	G	34	5750.18:2918.53			+		Ala95-Gly	0	
AY065843	346	107	A	G	39	7784.09:4900.21		+			M107-Ile	+1	Leu in gb JX965151.1
	416	131	G	A	26	4815.24:1642.14		+			Gly131-Arg	-2	
	719	232	A	A	8	8762.17:788.97		+			Arg232-Ser	-1	Val in gb JF693033.1
	838		G	C	37	1131.73:671.01			+	+	Silent		
	913	296	C	A	7	1863.66:129.80					Phe296-Leu		Not confirmed
	28		T	C	38	120.90:75.09					Non-coding		
8/NSP2	36		G	C	22	155.18:35.18					Non-coding		wt SA11 J02353
L04532	37		C	G	24	137.07:44.30					Non-coding		
	39		G	T	43	131.18:98.40					Non-coding		
	69		A	G	36	500.89:283.49					Silent		
	75		T	C	29	505.79:217.30					Silent		
	367	108	A	G	57	847.66:650.86					Ile108-Val	+3	wt SA11 Q03243
	591		G	A	8	6277.21:539.48					Silent		
	643	200	A	G	36	3478.14:1971.24					Val200-Ile	+3	SA11 R01TSE (L20901) or mutated as L, E or G
9/VP7	186		A	G	35	1470.88:819.33			+		Silent		
V01546	192		C	T	41	1668.39:1133.14			+	+	Silent		
	226	60	A	G	5	3706.05:175.19				+	Thr60-Ala	0	wt SA11 K02028.1
	238	64	A	G	85	3839.20:655.25	+		+	+	Asp64-Asn	+1	
	738		T	C	22	9538.05:2649.03					Silent		
	997		C	T	48	6313.13:5890.15					Silent		
10/NSP4	320		T	C	44	50334.20:40079.58	+				Silent		
K01138	416	125	G	T	8	37048.18:2988.52					Glu125-Asp		Not confirmed
	431		T	C	22	34888.58:9883.06				+	Silent		

Table 3 (Continued)

Gene/ protein GenBank	Nuc. pos.	Aa. pos.	wt base	Mutation	% mutation	BaCON score wt:mut	ts mutant				aa change	Blosom	Comments
							D	H	I	J			
11/NSP5,NSP6 M28347	No Mutation												

The rotavirus genes with the encoded protein are indicated with the reference sequences used in the read mapping. The mutations found in more than 5% of the sequences by deep sequencing are indicated. The wild type nucleotide (wt base), nucleotide position (nuc. pos.) and amino acid position (aa. pos.) in the reference sequence (GenBank) are indicated. The percentage of reads bearing the mutation (% mutation), the BaCON quality scores from sequencing of the wt and the mutated bases are indicated. The nucleotide positions of the mutations re-investigated by sequencing individual RT-PCR products are framed. The mutations in the amino acid sequence are indicated (aa change; wt amino acid followed by position number and mutated amino acid) with its Blosom62 change (Henikoff and Henikoff, 1992). "Comments" indicate the references for sequences bearing the mutation. "Not confirmed" indicates the mutation was not found by Sanger sequencing of individual RT-PCR products. The assignment of a mutation to a particular ts mutant by Sanger sequencing of individual RT-PCR fragments is indicated; the mutations that are considered a possible cause of the ts phenotype are grayed. The partial nucleotide sequences of gene 7 from SA11 tsH and tsI mutants have been deposited in GenBank with the accession numbers JQ687099 and JQ687100. The sequences of gene 5 from SA11 tsJ, H and I were deposited with the accession numbers JX417180, JX417181 and JX417182, respectively.

were obtained with the Blosom100 and PAM30 (Point Accepted Mutation) matrices.

### 3.2.1. Mutations in gene 1 (VP1)

Mutations at amino acids 1034 (His to Tyr) and 1074 (Ser to Thr) of VP1 were detected by deep sequencing (Table 3). Despite their low occurrence (9% for position 1074) or low sequence quality (<50 for position 1034), these two mutations were analyzed by RT-PCR and Sanger sequencing because the viral RNA polymerase encoded by gene 1 is a vital enzyme for rotavirus replication (Lu et al., 2008). Neither mutation was confirmed by RT-PCR and Sanger sequencing of each mutant. However, silent mutations at position 3141 and 3177, which satisfy our frequency and sequence quality criteria, were detected in PCR products from mutants H and J, respectively, thereby indirectly confirming the conclusion that the mutations at positions 3118 and 3238 were likely deep sequencing errors. Thus, no amino acid mutations were found in VP1.

### 3.2.2. Mutations in gene 2 (VP2)

VP2 constitutes the innermost layer of the rotavirus particle. Position Ile213 in the SA11 sequence corresponds to Ileu211 in the UK strain that has been crystallized (McClain et al., 2010). Ile213 is not a variable position in VP2. The non-conservative change Ileu213Thr is present in alpha helix H4 of VP2 (Fig. S1A), which is in a hydrophobic pocket underneath alpha helix H5 that makes multiple contacts with VP6 at the 3 fold axes (Fig. S1B, (Settembre et al., 2011)). Changing Ileu213 to a threonine could weaken the VP2–VP6 interaction by raising H5 and could possibly be responsible for the ts phenotype. The Ileu213Thr change was detected in gene 2 of Baylor SA11 mutant tsD by sequencing individual RT-PCR products (Table 3).

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.05.018>.

### 3.2.3. Mutations in gene 3 (VP3)

Little is known about the structure of VP3, the enzyme that adds the cap structure to the 5' end of rotavirus mRNA (Liu et al., 1992). Four mutations that induce amino acid changes in VP3 were observed (Table 3). Three of these amino acid changes are either neutral or conservative (Val127Ala, His319Asp and Asn804Ser) and cannot be considered directly involved in the ts phenotype. Conversely, the Tyr97Cys mutation is a non-conservative change (Henikoff and Henikoff, 1992) that is particularly unfavorable for external proteins (Betts and Russell, 2003); the introduction of a cysteine in the VP3 sequence could greatly impair the function of the extracellular, virion form of VP3 by inducing the formation of intra- or inter-molecular disulfide bonds. Thus, the Tyr97Cys mutation in mutant H could possibly be responsible for the ts phenotype (Table 3).

Due to the importance of the last 8 nucleotides at the 3' end of rotavirus mRNA for both replication and translation (Chen et al., 1990; Vende et al., 2000), a mutation at position 2589 in the 3' non-coding sequence of gene 3 was investigated despite a low quality score (Table 3). None of the mutants contained the A2589G nucleotide substitution.

### 3.2.4. Mutations in gene 4 (VP4)

Gene 4 encodes VP4, the spike protein that is cleaved into VP5\* and VP8\* by trypsin and that undergoes dramatic structural changes during viral entry into cells (Yoder et al., 2009). Three amino acid changes were detected (Table 3). Two of these changes (Fig. S2A and S2B) are neutral or conservative and occur in loops (Settembre et al., 2011); the Gly382Ala mutation is at the beginning of the putative membrane interaction loop (Dormitzer et al., 2004) of VP4, and the Asn477Asp mutation is in the loop joining the globular domain of VP5\* and the trimerization domain formed by a triple coiled coil. Furthermore, Asn477 is changed to a serine in a wild type SA11 strain (D/128; JX274502). Thus, we considered these two amino acid changes not to be involved in the ts phenotype. The non-conservative Ser19Cys mutation (Fig. S2C) is localized in a region of VP4 that is thought to contribute to the stabilization of the VP8\* domain and the spike trimer (Pesavento et al., 2005). Because VP4 is an outer capsid protein, the oxidation of cysteines at position 19, which are in close proximity in the pre-entry trimer structure (Fig. S2C), could induce the formation of inter-molecular disulfide bonds that might block the structural changes required for virus entry. The Ser19Cys mutation has been found only in gene 4 of the Baylor SA11 tsD mutant.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.05.018>.

### 3.2.5. Mutations in gene 5 (NSP1)

Gene 5 encodes NSP1, an anti-interferon response protein (Arnold and Patton, 2011; Sherry, 2009). The structure of NSP1 is not known, and NSP1 is the most variable rotavirus protein (Dunn et al., 1994). The amino acid sequence of NSP1 deduced from the nucleotide sequences of Baylor SA11 mutants D, H and J was identical to the sequence of human rotavirus G3ZTR-5 candidate vaccine (JF896471) NSP1 (Table 3). Only one conservative change, the Asn476Ser mutation, was detected by deep sequencing and was assigned to Baylor SA11 mutant tsI by RT-PCR and Sanger sequencing. Residue 476 is positioned in the most variable part of NSP1 (Dunn et al., 1994; Patton et al., 2001) and is frequently replaced with different amino acids, such as Thr, Glu, Lys or Ala. Several human rotaviruses have a serine at position 476 (Castello et al., 2009). Furthermore, rotavirus mutants with a deletion in gene 5 that includes the 476 region or with premature stop codons leading to a protein that is reduced to the first 40–50 amino acids of NSP1 are able to grow to high titers and to form plaques even



if NSP1 expression is undetectable (Patton et al., 2001; Taniguchi et al., 1996). Therefore, the neutral Asn476Ser mutation is unlikely to cause the ts phenotype.

Gene 5 in the SA11 strains has a polymorphism in the 3' non-coding sequence (Small et al., 2007); Baylor SA11 mutants H, I and J were identical to the SA11-4F (AF290883) strain, whereas the Baylor SA11 mutant D 3' non-coding sequence was identical to that of the SA11-FEM strain (AF90882), as determined by sequencing the individual RT-PCR products (Table 3). Thus, no mutation that could account for a ts phenotype was found in gene 5.

### 3.2.6. Mutations in gene 6 (VP6)

VP6 assembles into trimers to form the middle shell of the viral capsid (Mathieu et al., 2001) where it comes into contact with the two outer shell proteins, VP7 and VP4, and the inner shell protein, VP2 (Pesavento et al., 2006). VP6 has no known enzymatic activity on its own, but VP6 is required for the RNA polymerase activity of the double-layered particles (Feng et al., 2002; Libersou et al., 2008).

The Ala121Gly mutation (Table 3) is positioned in a short loop of VP6 connecting two alpha helices (Fig. S3). This mutation has been observed in many human and animal rotaviruses (for example, EF583016 and EF583009) and, thus, was not considered able to confer a ts phenotype (Mansell et al., 1994). The three other mutations (Asp13His, Pro55Thr, Pro309Ala; Fig. S3) are non-conservative (Henikoff and Henikoff, 1992). Asp13His is positioned (Fig. S3) in an N-terminal alpha helix at the center of the VP6 trimer (Mathieu et al., 2001). Whereas each ts mutant was isolated from an independent mutagenesis event to avoid isolating clonally related mutants (Ramig, 1983), two mutations (Asp13His and Ala121Gly) present in gene 6 of the Baylor SA11 tsG are also present in gene 6 in the Baylor SA11 tsJ mutant. Together with a conservative Thr10Ser mutation, the Asp13His mutation correlates with a defect in the assembly of VP6 into double-layered particles (Mansell et al., 1994). The Pro309Ala mutation lies close to the Pro313 and Asn310 residues that form van der Waals and H-bonds, respectively, with VP7 (McClain et al., 2010). Thus, the Pro309Ala mutation could modify the contacts between VP6 and VP7 and may impair the assembly of the infectious particle at the non-permissive temperature. The Pro55Thr mutation lies within a hairpin (aa 42–74) that makes contact with VP4 (Li et al., 2009) and is assumed to facilitate extrusion of the RNA transcripts from the viral particle (Mathieu et al., 2001). The four mutations were all attributed to the Baylor SA11 tsJ mutant after sequencing individual RT-PCR products (Table 3).

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.05.018>.

### 3.2.7. Mutations in gene 7 (NSP3)

Gene 7 encodes NSP3, a protein consisting of 315 amino acids. NSP3 is an obligate dimer made of two separable domains: an RNA-binding domain (amino acids 3–150) that specifically recognizes the nucleotide sequence GACC present at the 3' end of most rotavirus mRNAs (Deo et al., 2002; Poncet et al., 1993, 1994) and a C-terminal domain (amino acids 150–313) that forms a coiled coil and interacts with the translation initiation factor eIF4G (Groft and Burley, 2002; Piron et al., 1998, 1999). Four amino acid changes were found in gene 7 (Table 3). The conservative Met107Ile change is found in human (ACZ51608) and bovine (ACB38349) rotavirus NSP3 and was considered a variable amino acid position. Arg232 is a variable position in NSP3 that is changed to an alanine or isoleucine in several sequences (Groft and Burley, 2002). Furthermore, Arg232 is positioned in the coiled coil dimerization domain of NSP3 (Piron et al., 1999), but replacing Arg232 with Ser does not change the probability of coiled coil formation in this region as estimated by the Lupas algorithm (data not shown (Lupas et al., 1991)).

The Gly131Lys mutation (Fig. S4) replaces a small hydrophobic amino acid with a large charged amino acid. The mutation is positioned in a loop either in contact with RNA (green monomer, Fig. S4) or that lies outside the core of the RNA-binding domain (blue monomer, Fig. S4), depending on which subunit of the NSP3 dimer it belongs to. Thus, this amino acid change could impair both binding of NSP3 to RNA and folding of the NSP3 RNA-binding domain.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.05.018>.

The mutation of alanine 95 to glycine is, at first glance, very modest because this is usually considered a conservative, neutral change (Henikoff and Henikoff, 1992). However, alanine is an alpha helix stabilizing residue, whereas glycine is a helix breaking residue; therefore, a change from an alanine to a glycine can be particularly detrimental if it occurs in an alpha helix (Blaber et al., 1993; Chakrabarty et al., 1991; Serrano et al., 1992). In NSP3, Ala95 is positioned in alpha helix H5 (Fig. S4), which is involved simultaneously in RNA binding and the dimerization of the RNA-binding domain of NSP3 (Deo et al., 2002); therefore, this mutation can be detrimental to proper folding of the NSP3 RNA-binding domain. Sequencing of individual RT-PCR products allowed the assignment of mutation Ala95Gly to Baylor SA11tsI, whereas the Gly131Lys mutation, together with the M107Ile and Arg232Ser mutations, was assigned to Baylor SA11tsH (Table 3).

### 3.2.8. Mutations in gene 8 (NSP2)

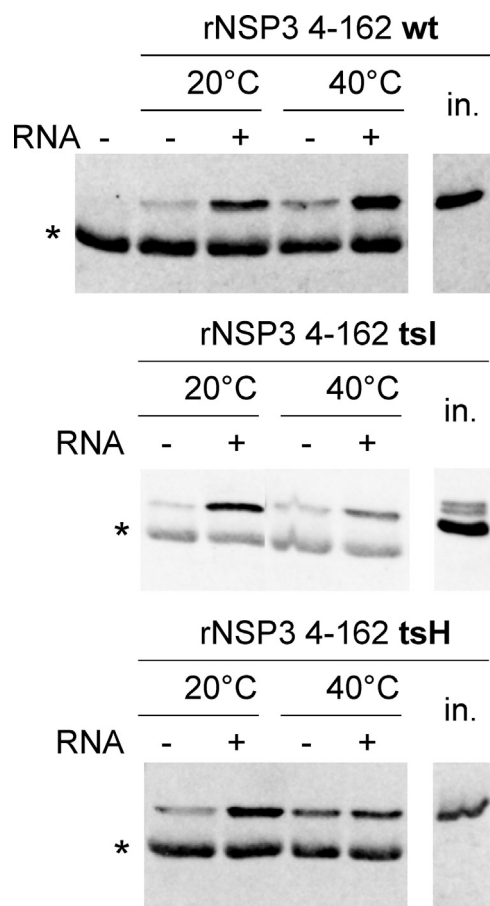
The two mutations found in the gene 8 coding sequence (Ile108Val and Val200Ile) are present in several rotaviruses. Ile108Val is present in a wild type SA11 rotavirus. Val200Ile is present in the rotavirus Baylor SA11 tsE mutant (assigned to gene 8 (Gombold et al., 1985)), but this position is known to be highly variable and not involved in the thermo-sensitive phenotype (Taraporewala et al., 2002). Thus, no mutation that could account for a ts phenotype was found in gene 8.

### 3.2.9. Mutations in gene 9 (VP7)

Gene 9 encodes the external glycoprotein VP7, which is involved in rotavirus entry. Two non-silent mutations at amino acids 60 and 64 were detected by RNA-seq (Table 3). Both mutations occur outside the known structure of VP7 (Aoki et al., 2009). The Thr60Ala mutation is also present in the VP7 sequences derived from a wild-type SA11 strain (K02028). The Asp64Asn mutation is a neutral, favored mutation (Henikoff and Henikoff, 1992) that is present in three of the four mutants; therefore, this mutation cannot be linked to a ts phenotype. As noted by Ramig and Petrie (Ramig and Petrie, 1984), the original parental virus was a mixture that produced two forms of VP7 measuring 36 and 38 kD. The two forms of VP7 segregated independently into the different ts mutants: mutant H produces the 38 kD VP7 variant, whereas mutants D, I and J produce the shorter form of VP7 (see Fig. 1 in (Ramig and Petrie, 1984)). Sequencing the individual RT-PCR products showed that gene 9 in mutant tsH had the Ala60/Asn64 combination of amino acids, whereas gene 9 in mutants D, I and J had the Thr60/Asp64 combination. Thus, no mutation that could account for a ts phenotype was found in gene 9.

### 3.2.10. Mutations in genes 10 (NSP4) and 11 (NSP5/NSP6)

Only silent mutations were detected in the gene 10 ORF by deep sequencing and confirmed by sequencing the RT-PCR of the entire genes. No mutations were found in the gene 11 ORF by deep sequencing or classical sequencing of the RT-PCR products upon comparison with the wild-type SA11 reference sequence M28347.



**Fig. 1.** Ala95Gly and Gly131Arg mutations impair the RNA-binding properties of NSP3. The NSP3 RNA-binding domain (3–162) in SA11 wt, tsH (Gly131Arg) and tsI (Ala95Gly) strains was purified and used in a RNA pull-down assay. Proteins bound to avidin beads without (RNA–; unspecific background) or with RNA (RNA+) after incubation and washes at 20 °C (permissive temperature) or 40 °C (non-permissive temperature) were detected by western blotting. The bands indicated by \* correspond to neutravidin released from the beads (see first lane “beads only,” top panel). Lanes “in.” correspond to 1/4th (125 ng) of the proteins used for each point in the assay. Note that trace amounts of poorly cleaved GST-NSP3 fusion proteins (double band above the NSP3 tsI lane in.) were present in the tsI protein preparation.

### 3.3. The RNA-binding activity of NSP3 is impaired by the Ala95Gly and Gly131Arg mutations

Gene 7 (encoding NSP3) is the only gene that presents potential ts mutations (Table 3) and that has not already been assigned to a Baylor SA11 complementation group. To determine whether the mutations detected in the RNA-binding domain of NSP3 could alter the properties of the protein at the non-permissive temperature, the RNA-binding domains (amino acids 4–168) of the wt NSP3 protein and of the Ala95Gly and Gly131Arg mutants were produced in *E. coli* and purified. The recombinant proteins were then incubated at the permissive (20 °C) or non-permissive (40 °C) temperatures with a synthetic RNA (representing the 3' end of a rotavirus mRNA with which NSP3 interacts) and immobilized on streptavidin beads, or, as a negative control, with plain streptavidin beads. The proteins bound to the beads (with or without RNA) were quantified by western blotting (Fig. 1). The ratio of binding at the non-permissive temperature versus binding at the permissive temperature was calculated after subtracting the non-specific binding (obtained from beads incubated without RNA at each temperature). This ratio was 1.8 for the wt strain and 0.2 and 0.6 for the Gly131Arg and Ala95Gly mutants, respectively. Whereas raising the temperature of incubation with RNA increased the quantity of wt protein bound to RNA

by twofold, the same temperature change lowered the quantity of mutant protein bound to RNA by two- to fivefold. This experiment showed that the mutations Gly131Lys and Ala95Gly do confer a temperature-sensitive RNA-binding phenotype to NSP3.

## 4. Discussion

### 4.1. Advantages of RNA-seq for sequencing the whole rotavirus genome

One result from our study is that RNA-seq can be used to sequence whole rotavirus genomes. This approach presents several advantages over classical cloning or PCR followed by sequencing: (1) RNA-seq can be performed directly on dsRNA extracted from the medium of infected cells, thus avoiding multiple amplifications of the inoculum that might favor the emergence of revertants; (2) RNA-seq is independent of the knowledge of the 5' and 3' end sequences; and (3) if enough reads are obtained, RNA-seq allows the sequences of the 5' and 3' ends to be determined because reverse transcription and PCR are performed with primers ligated to the 3' ends independently of the RNA sequence (Potgieter et al., 2009; Wang et al., 2009). The number of reads per rotavirus gene was variable and did not correlate with gene length (Table 2). The base coverage was very high on average (more than one thousand) but variable inside each gene; for example, each base of gene 2 was covered by more than ten thousand reads on average, but a region in the same gene was covered by only 17 reads (Tables S1 and 2). Coverage of the first 5' or last 3' nucleotides of the rotavirus genes has also been variable from one gene to another (Table 2); some ends were covered by only a few reads, while the first 5' G in gene 2 was covered by several hundred reads. A bias toward the extreme 5' and 3' mRNA ends is inherent to the RNA-seq technique (Wang et al., 2009), and a greater number of viral sequences and better coverage of the 5' and 3' ends would have been obtained by a more thorough elimination of the rRNA during virus purification (our unpublished results) or by elimination of the short RNAs generated by RNase treatment. However, the complete coding sequence of each gene was thoroughly sequenced, and the low coverage of the 5' and 3' ends is limited to the five first or last nucleotide ends (Table S1).

The primary drawback of using RNA-seq to determine the sequence of a rotavirus strain was that several mutations detected by RNA-seq were not confirmed by sequencing the RT-PCR products. This result could be due to a lower quality of sequencing data obtained with the Illumina procedure versus the Sanger dye-terminator sequencing method (Abnizova et al., 2010). For example, influence of base composition and sequence on the accuracy of Illumina sequencers has been reported previously (Abnizova et al., 2012; Nakamura et al., 2011). High-throughput sequencings are more error prone than Sanger sequencing but Illumina platforms has the lowest sequencing error rates (below 0.4%, (Quail et al., 2012)). However, this result could have also originated from viral quasispecies sequences present at a low frequency in each mutant strain. It should be noted that our Sanger sequencing was made on the whole RT-PCR product (amplification from a population of molecules) whereas Illumina sequencing is done on amplified unique DNA molecules and is thus probably more prone to detect low frequency variation such as quasi-species and Single Nucleotide Polymorphisms (Abnizova et al., 2010).

### 4.2. Assignment of mutant genes to the Baylor SA11ts D, H, I and J groups

Can a genome segment be assigned to the D, H, I and J groups of Baylor SA11 ts mutants from the whole genome analysis presented here and previous genetic analysis (Ramig, 1983)?

**Table 4**

Recapitulative tables of the known rotavirus prototype ts mutants.

Rotavirus reassortment group	According to this report			According to previous reports			39 °C recomb. according to (4)
	Prototype ts mutant	Mutation on segment/protein (accession)	Mutations	Prototype ts mutant	Mutation on segment/protein (accession)	Mutations references	
A				SA11 tsA (778)	4/VP4	A401-T Refs. (1, 7)	+
B				SA11 tsB (339)	3/VP3 (DQ838600)	G526-D Refs. (5 and 2)	Low with tsH
C				SA11 tsC (606)	1/VP1 (DQ838601)	L138-P Ref. (2)	+
D	SA11 tsD (975)	2/VP2 4/VP4	I213-T S19-C	RRV tsD7	5/NSP1 (HQ665462)	L140-V Ref. (3)	+
E				SA11 tsE (1400)	8/NSP2 (L20901)	H127-R A152-V V200-I Refs. (5, 7, 8, and 2)	+
F				SA11 tsF (2124)	2/VP2 (L20084)	A387-D Refs. (2, 6, and 7)	+
G				SA11 tsG (2130)	6/VP6 (L15384)	T10-S D13-H A121-G Refs. (2, 6, and 7)	None with tsJ
H	SA11 tsH (2384)	3/VP3 7/NSP3 (JQ687099)	Y97-C G131-R K232-S M107-I	SA11 tsH (2384)	– <sup>a</sup>		Low with tsB & tsI
I	SA11 tsI (2403)	7/NSP3 (JQ687100)	A95-G	SA11 tsI (2403)	– <sup>b</sup>	No mutation in gene 10 ORF Ref. (1)	Low with tsH
J	SA11 tsJ (2131)	6/VP6	D13-H P55-T A121-G P309-A	RRV tsJ(5)	11/NSP5 (HQ665464)	A182-G Ref. (1)	None with tsG
K				RRV tsK(2)	9/VP7 (HQ665463)	T280-I Ref. (1)	

The mutations (amino acid, single letter code) reported here and by previous studies are indicated for each reassortment group of rotavirus ts mutant. The ts mutant prototype used is indicated. Sequence accession numbers are indicated when known.

The following are relevant references: (1) Criglar et al. (2011), (2) Small et al. (2007), (3) Taraporewala et al. (2002), (4) Ramig (1983), (5) Gombold et al. (1985), (6) Mansell et al. (1994), and (7) Gombold and Ramig (1987).

<sup>a</sup> Based on gene 7 nucleotide sequences presented here.

<sup>b</sup> tsI was tentatively assigned to gene 10 (NSP4) by elimination, but no mutation was found in the coding sequence of gene 10.

#### 4.2.1. Mutant tsI

For Baylor SA11 tsI (Table 3), only conservative mutations were found; one mutation was located in NSP1 (Asn476-Ser), and the other mutation was located in NSP3 (Ala95-Gly). NSP1 anti-interferon function is now well established (Arnold and Patton, 2011; Sherry, 2009). However, assigning a ts mutation to gene 5 in general and to position 476 in particular (see Section 3.2.5) seems paradoxical because rotavirus mutants with a deletion in gene 5 or with premature stop codons leading to a protein reduced to the first 40–50 amino acids of NSP1 are still able to grow to high titers and to form plaques even when NSP1 expression is undetectable (Patton et al., 2001; Taniguchi et al., 1996).

The other mutation found in the Baylor SA11 tsI genome is positioned in the RNA-binding domain of NSP3 (Ala95Gly). Indeed, our RNA-binding assay (Fig. 1) showed that the Ala95Gly mutation impaired NSP3's RNA-binding ability at the non-permissive temperature. Thus, based on our biochemical and sequence data, the Baylor SA11 tsI mutant can be assigned to gene 7.

#### 4.2.2. Mutant tsH

Baylor SA11 tsH bears two mutations that we have considered as possible ts mutations. One mutation occurred in gene 7 (Gly131Arg, associated with Arg232Ser), which encodes NSP3 (Table 3). The Gly131Arg mutation in tsH has been shown here to weaken the RNA-binding properties of NSP3 at high temperatures (Fig. 1). The second possible ts mutation for Baylor SA11 tsH is the Tyr97Cys change in gene 3 (associated with the

conservative mutation Asn804Ser). However, Baylor SA11 tsB has been characterized as the prototype mutant assigned to gene 3 both by genetic analysis and DNA sequencing (Gombold et al., 1985). However, a previous report indicated (Ramig, 1983) that “a significantly lower recombination frequency was noted with tsB and tsI” at the permissive temperature and that “the tsH mutant was restricted in its recombination with the tsB and tsI mutants...” at the non-permissive temperature (Ramig, 1983). Thus, considering Baylor SA11 tsI to be the prototype mutant assigned to gene 7 (see Section 4.2.1), Baylor SA11 tsB to be the prototype mutant assigned to gene 3, and Baylor SA11 tsH to be a double mutant with ts mutations in genes 3 and 7 would reconcile our sequencing analysis of the Baylor SA11 tsH mutant with this earlier genetic analysis.

#### 4.2.3. Mutant tsJ

A previous report noted that “...the tsG and tsJ mutants failed to recombine at detectable levels at non-permissive temperature” but “reassorted normally at permissive temperature and each reassorted with all other mutant groups at nonpermissive temperature” (Ramig, 1983). Thus, mutant tsJ cannot produce detectable wild-type particles when co-infected with mutant tsG at 39 °C, as expected for viruses bearing mutations in the same gene. Gene 6 has been assigned to mutant tsG (Mansell et al., 1994) by genetic analysis, and three mutations (Thr10Ser, Asp13His and Ala121Gly) were found in gene 6 (Mansell et al., 1994). Thus, the presence of a ts mutation in gene 6 in the tsJ mutant would agree with this



earlier genetic analysis. Remarkably, the three non-conservative mutations detected in the whole genome of the tsJ mutant are all positioned in the gene 6 ORF (Table 3). Although each single mutation may not be sufficient to induce a ts phenotype on its own, the combination of these mutations in the same molecule undoubtedly has detrimental effects on the VP6 protein structure in mutant J. However, if mutants J and G have mutations in the same gene, why do they reassort normally at the permissive temperature? The requirement of an additional mutation in the tsJ or tsG genome that allow the expression of the ts phenotype or the presence of a suppressor mutation for tsG gene 6 in the genome of tsJ and, conversely, a suppressor mutation for tsJ gene 6 in the tsG genome are two possible explanations, amongst others. Whether these suppressor functions could be fulfilled by the His319Asn and Gly382Ala conservative mutations found in genes 3 and 4 in tsJ (Table 3) is a question that remains to be experimentally addressed. The sequencing of the whole genome of the Baylor SA11 tsG mutant would also be required to exclude the presence of mutations other than those identified in gene 6 (Mansell et al., 1994).

#### 4.2.4. Mutant tsD

For the Baylor SA11 tsD mutant analyzed here, non-conservative mutations were found in genes 2 (Ile213Thr) and 4 (Ser19Cys), which encode VP2 and VP4, respectively, and one neutral mutation is present in gene 3 (Val127Ala). The Baylor SA11 tsF was previously assigned to gene 2, Baylor SA11 tsA was assigned to gene 4 (Gombold and Ramig, 1987), and Baylor SA11 tsB was assigned to gene 3 (Table 4). However, the Baylor SA11 tsD mutant reassorted normally with each of these ts mutants and was placed in a reassortment group distinct from A, F or B. A likely explanation is that at least two mutations in two different genes need to be associated to confer a ts phenotype to Baylor SA11 tsD. Thus, the independent segregation of these mutations during the cross of tsD with any other ts mutant would have led to a significant disproportion of temperature-resistant progeny and therefore would have placed tsD into a separate reassortment group.

#### 4.3. Comparison with RRVts gene assignments

Recently, the collection of Baylor SA11 ts mutants was matched with the NIH-RRV collections of ts mutants (Criglar et al., 2011), and reassortment mapping allowed each mutant group to be assigned to a gene (Table 4). The assignments we proposed above, based on our sequencing results of the Baylor SA11 ts prototypes and on previous genetic analysis (Ramig, 1983), are not in accord with this classification (Table 4). Furthermore, our sequencing data on the Baylor SA11 ts mutants do not match the sequencing data published for the NIH RRV ts mutant (Criglar et al., 2011). The Baylor SA11 tsJ mutant (2131) that we sequenced (by Illumina and Sanger sequencing) has no mutations in the ORF of gene 11, whereas RRV tsJ(5) has an Ala182Gly mutation (Criglar et al., 2011). The RRV tsI mutant was tentatively assigned to gene 10, but no mutation was found in the ORF of gene 10 (Criglar et al., 2011). We found a mutation in gene 7 in the Baylor SA11 tsI mutant and showed that this mutation disabled the RNA-binding properties of NSP3 at the non-permissive temperature. The Baylor SA11 tsD mutant (975) that we sequenced (by Illumina and Sanger sequencing) does not have a mutation in the ORF of gene 5, whereas Criglar et al. found a conservative Leu140Val mutation in the RRVtsD(7) that is also present in a wild type mouse rotavirus (Q83444). The existence of mutations in the non-coding sequences or silent mutations that could lead to a ts phenotype by affecting the structure of the mRNA is a possibility that might account for the discrepancies between Criglar et al.'s analysis and ours. Such mutations have been observed in the highly structured IRES of poliovirus (Dildine

and Semler, 1989; Racaniello and Meriam, 1986) or in a transcription regulatory region of RSV (Whitehead et al., 1998). However, a more likely explanation to account for the discrepancies between Criglar's analysis and ours is that the presence of more than one disabled gene in the same mutant (Baylor SA11 D and H), or of suppressor (Baylor SA11 tsG and tsJ) or "synthetic ts" (Baylor SA11 tsD) mutations, has distorted this complex genetic analysis and blurred the gene assignment. Extensive sequencing of the entire genome of all rotavirus ts mutants is desirable.

Before this work, six of the ten Baylor SA11 ts group mutants had been assigned to a particular gene segment both by genetic analysis and targeted gene sequencing (Table 4). Our work allows the Baylor SA11 tsI mutant to be added as the prototype ts mutant for gene 7 (NSP3). Identification of ts mutations in the RNA-binding domain of NSP3 in mutants I and H indicated that this protein is probably not dispensable for virus replication and allows gene 7 to be amenable to reverse genetic approaches (Trask et al., 2010). Conversely, the presence of mutations in two different genes in mutants tsH and tsD might preclude the use of these mutants as helper viruses in reverse genetics assays (Komoto et al., 2006).

#### Acknowledgments

We thank Dr. RF Ramig (Baylor College of Medicine, Houston, USA) for kindly providing titrated inoculums of the Baylor collection of ts mutants, sharing unpublished data and for critical reading of an early version of the manuscript. We thank Dr. S. Bressanelli (VMS, Gif sur Yvette, France) for analysis of VP2 structure and tsD mutation and help in 3D representation. M.G. was supported by a PhD fellowship from the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie. M.S. was supported by a post-doc fellowship from Agence Nationale de la Recherche. PV, AC and DP are staff members of the Institut National de la Recherche Agronomique (France). MD is a staff member of Université d'Evry Val d'Essonne (France). This work was in part supported by Agence Nationale de la Recherche ANR09MIE-023 "TransInfRot P008622" to DP, it has benefited from the facilities and expertise of the IMAGIF Sequencing Unit of the CNRS campus in Gif sur Yvette ([www.imagif.cnrs.fr](http://www.imagif.cnrs.fr)) supported by the Conseil Général de l'Essonne (France). Thanks to C. Laroche for technical assistance, to M. Sylvain, E Van Dijk (from platform IMAGIF) for deep sequencing and reads mapping.

#### References

- Abnizova, I., Leonard, S., Skelly, T., Brown, A., Jackson, D., Gourtovaia, M., Qi, G., Te Boekhorst, R., Faruque, N., Lewis, K., Cox, T., 2012. Analysis of context-dependent errors for illumina sequencing. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology* 10 (2), 1241005.
- Abnizova, I., Skelly, T., Naumenko, F., Whiteford, N., Brown, C., Cox, T., 2010. Statistical comparison of methods to estimate the error probability in short-read illumina sequencing. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology* 8 (3), 579–591.
- Aoki, S.T., Settembre, E.C., Trask, S.D., Greenberg, H.B., Harrison, S.C., Dormitzer, P.R., 2009. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. *Science* 324 (5933), 1444–1447.
- Arnold, M.M., Patton, J.T., 2011. Diversity of interferon antagonist activities mediated by NSP1 proteins of different rotavirus strains. *Journal of Virology* 85 (5), 1970–1979.
- Betts, M.J., Russell, R.B., 2003. Amino acid properties and consequences of substitutions. In: Barnes, M.R., Gray, I.C. (Eds.), *Bioinformatics for Geneticists*. Wiley, Chichester, UK, p. 408.
- Blaber, M., Zhang, X.J., Matthews, B.W., 1993. Structural basis of amino acid alpha helix propensity. *Science* 260 (5114), 1637–1640.
- Castello, A.A., Nakagomi, T., Nakagomi, O., Jiang, B., Kang, J.O., Glass, R.I., Glikmann, G., Gentsch, J.R., 2009. Characterization of genotype PG12 rotavirus strains from Argentina: high similarity with Japanese and Korean G12 strains. *Journal of Medical Virology* 81 (2), 371–381.
- Chakraborty, A., Schellman, J.A., Baldwin, R.L., 1991. Large differences in the helix propensities of alanine and glycine. *Nature* 351 (6327), 586–588.

- Chen, D., Gombold, J.L., Ramig, R.F., 1990. Intracellular RNA synthesis directed by temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11. *Virology* 178 (1), 143–151.
- Cohen, J., Laporte, J., Charpilienne, A., Scherrer, R., 1979. Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Archives of Virology* 60 (3–4), 177–186.
- Criglar, J., Greenberg, H.B., Estes, M.K., Ramig, R.F., 2011. Reconciliation of rotavirus temperature-sensitive mutant collections and assignment of reassortment groups D, J, and K to genome segments. *Journal of Virology* 85 (10), 5048–5060.
- Deo, R.C., Groft, C.M., Rajashankar, K.R., Burley, S.K., 2002. Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer. *Cell* 108 (1), 71–81.
- Dildine, S.L., Semler, B.L., 1989. The deletion of 41 proximal nucleotides reverts a poliovirus mutant containing a temperature-sensitive lesion in the 5' noncoding region of genomic RNA. *Journal of Virology* 63 (2), 847–862.
- Dormitzer, P.R., Nason, E.B., Prasad, B.V., Harrison, S.C., 2004. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature* 430 (7003), 1053–1058.
- Dunn, S.J., Cross, T.L., Greenberg, H.B., 1994. Comparison of the rotavirus nonstructural protein NSP1 (NS53) from different species by sequence analysis and northern blot hybridization. *Virology* 203 (1), 178–183.
- Feng, N., Lawton, J.A., Gilbert, J., Kuklin, N., Vo, P., Prasad, B.V., Greenberg, H.B., 2002. Inhibition of rotavirus replication by a non-neutralizing, rotavirus VP6-specific IgA mAb. *Journal of Clinical Investigation* 109 (9), 1203–1213.
- Gombold, J.L., Estes, M.K., Ramig, R.F., 1985. Assignment of simian rotavirus SA11 temperature-sensitive mutant groups B and E to genome segments. *Virology* 143 (1), 309–320.
- Gombold, J.L., Ramig, R.F., 1987. Assignment of simian rotavirus SA11 temperature-sensitive mutant groups A, C, F, and G to genome segments. *Virology* 161 (2), 463–473.
- Groft, C.M., Burley, S.K., 2002. Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Molecular Cell* 9 (6), 1273–1283.
- Harb, M., Becker, M.M., Vitour, D., Baron, C.H., Vende, P., Brown, S.C., Bolte, S., Arold, S.T., Poncet, D., 2008. Nuclear localization of cytoplasmic poly(A)-binding protein upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G and RoXa. *Journal of Virology* 82 (22), 11283–11293.
- Henikoff, S., Henikoff, J.G., 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (22), 10915–10919.
- Komoto, S., Sasaki, J., Taniguchi, K., 2006. Reverse genetics system for introduction of site-specific mutations into the double-stranded RNA genome of infectious rotavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (12), 4646–4651.
- Levin, J.Z., Yassour, M., Adiconis, X., Nusbaum, C., Thompson, D.A., Friedman, N., Nirkhe, A., Regev, A., 2010. Comprehensive comparative analysis of strand-specific RNA sequencing methods. *Nature Methods* 7 (9), 709–715.
- Li, Z., Baker, M.L., Jiang, W., Estes, M.K., Prasad, B.V., 2009. Rotavirus architecture at subnanometer resolution. *Journal of Virology* 83 (4), 1754–1766.
- Libersou, S., Siebert, X., Ouldali, M., Estrozi, L.F., Navaza, J., Charpilienne, A., Garnier, P., Poncet, D., Lepault, J., 2008. Geometric mismatches within the concentric layers of rotavirus particles: a potential regulatory switch of viral particle transcription activity. *Journal of Virology* 82 (6), 2844–2852.
- Liu, M., Mattion, N.M., Estes, M.K., 1992. Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology* 188 (1), 77–84.
- Lu, X., McDonald, S.M., Tortorici, M.A., Tao, Y.J., Vasquez-Rad Carpio, R., Nibert, M.L., Patton, J.T., Harrison, S.C., 2008. Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Structure* 16 (11), 1678–1688.
- Lupas, A., Van Dyke, M., Stock, J., 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252 (5010), 1162–1164.
- Mansell, E.A., Ramig, R.F., Patton, J.T., 1994. Temperature-sensitive lesions in the capsid proteins of the rotavirus mutants tsF and tsG that affect virion assembly. *Virology* 204 (1), 69–81.
- Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., Prasad, B.V., Cohen, J., Rey, F.A., 2001. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *EMBO Journal* 20 (7), 1485–1497.
- McClain, B., Settembre, E., Temple, B.R., Bellamy, A.R., Harrison, S.C., 2010. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 397 (2), 587–599.
- Milne, I., Bayer, M., Cardle, L., Shaw, P., Stephen, G., Wright, F., Marshall, D., 2010. Tablet – next generation sequence assembly visualization. *Bioinformatics* 26 (3), 401–402.
- Nakamura, K., Oshima, T., Morimoto, T., Ikeda, S., Yoshikawa, H., Shiwa, Y., Ishikawa, S., Linak, M.C., Hirai, A., Takahashi, H., Altaf-Ul-Amin, M., Ogasawara, N., Kanaya, S., 2011. Sequence-specific error profile of Illumina sequencers. *Nucleic Acids Research* 39 (13), e90.
- Patton, J.T., Taraporewala, Z., Chen, D., Chizhikov, V., Jones, M., Elhelu, A., Collins, M., Kearney, K., Wagner, M., Hoshino, Y., Gouvea, V., 2001. Effect of intragenic rearrangement and changes in the 3' consensus sequence on NSP1 expression and rotavirus replication. *Journal of Virology* 75 (5), 2076–2086.
- Pesavento, J.B., Crawford, S.E., Estes, M.K., Prasad, B.V., 2006. Rotavirus proteins: structure and assembly. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 309, 189–219.
- Pesavento, J.B., Crawford, S.E., Roberts, E., Estes, M.K., Prasad, B.V., 2005. pH-induced conformational change of the rotavirus VP4 spike: implications for cell entry and antibody neutralization. *Journal of Virology* 79 (13), 8572–8580.
- Piron, M., Delaunay, T., Grosclaude, J., Poncet, D., 1999. Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4G-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *Journal of Virology* 73 (7), 5411–5421.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J., Poncet, D., 1998. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO Journal* 17 (19), 5811–5821.
- Poncet, D., Aponte, C., Cohen, J., 1993. Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *Journal of Virology* 67 (6), 3159–3165.
- Poncet, D., Laurent, S., Cohen, J., 1994. Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *EMBO Journal* 13 (17), 4165–4173.
- Potgieter, A.C., Page, N.A., Liebenberg, J., Wright, I.M., Landt, O., van Dijk, A.A., 2009. Improved strategies for sequence-independent amplification and sequencing of viral double-stranded RNA genomes. *Journal of General Virology* 90 (Pt 6), 1423–1432.
- Quail, M.A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T.D., Harris, S.R., Connor, T.R., Bertoni, A., Swerdlow, H.P., Gu, Y., 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 13, 341.
- Racaniello, V.R., Meriam, C., 1986. Poliovirus temperature-sensitive mutant containing a single nucleotide deletion in the 5' noncoding region of the viral RNA. *Virology* 155 (2), 498–507.
- Ramig, R.F., 1982. Isolation and genetic characterization of temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11. *Virology* 120 (1), 93–105.
- Ramig, R.F., 1983. Isolation and genetic characterization of temperature-sensitive mutants that define five additional recombination groups in simian rotavirus SA11. *Virology* 130 (2), 464–473.
- Ramig, R.F., 1997. Genetics of the rotaviruses. *Annual Review of Microbiology* 51, 225–255.
- Ramig, R.F., Petrie, B.L., 1984. Characterization of temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11: protein synthesis and morphogenesis. *Journal of Virology* 49 (3), 665–673.
- Rozen, R.F., Skaletsky, H., 1993. Primer3. Code available at <http://www-genome.wi.mit.edu/genome-software/other/primer3.html>
- Serrano, L., Neira, J.L., Sancho, J., Fersht, A.R., 1992. Effect of alanine versus glycine in alpha-helices on protein stability. *Nature* 356 (6368), 453–455.
- Settembre, E.C., Chen, J.Z., Dormitzer, P.R., Grigorieff, N., Harrison, S.C., 2011. Atomic model of an infectious rotavirus particle. *EMBO Journal* 30 (2), 408–416.
- Sherry, B., 2009. Rotavirus and reovirus modulation of the interferon response. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 29 (9), 559–567.
- Small, C., Barro, M., Brown, T.L., Patton, J.T., 2007. Genome heterogeneity of SA11 rotavirus due to reassortment with O' agent. *Virology* 359 (2), 415–424.
- Taniguchi, K., Kojima, K., Urasawa, S., 1996. Nondefective rotavirus mutants with an NSP1 gene which has a deletion of 500 nucleotides, including a cysteine-rich zinc finger motif-encoding region (nucleotides 156–248), or which has a nonsense codon at nucleotides 153–155. *Journal of Virology* 70 (6), 4125–4130.
- Taniguchi, K., Komoto, S., 2012. Genetics and reverse genetics of rotavirus. *Current Opinion in Virology* 2 (4), 399–407.
- Taraporewala, Z.F., Schuck, P., Ramig, R.F., Silvestri, L., Patton, J.T., 2002. Analysis of a temperature-sensitive mutant rotavirus indicates that NSP2 octamers are the functional form of the protein. *Journal of Virology* 76 (14), 7082–7093.
- Tate, J.E., Burton, A.H., Boschi-Pinto, C., Steele, A.D., Duque, J., Parashar, U.D., 2012. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases* 12 (2), 136–141.
- Trask, S.D., Taraporewala, Z.F., Boehme, K.W., Dermody, T.S., Patton, J.T., 2010. Dual selection mechanisms drive efficient single-gene reverse genetics for rotavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (43), 18652–18657.
- Vende, P., Piron, M., Castagne, N., Poncet, D., 2000. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *Journal of Virology* 74 (15), 7064–7071.
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10 (1), 57–63.
- Whitehead, S.S., Firestone, C.Y., Collins, P.L., Murphy, B.R., 1998. A single nucleotide substitution in the transcription start signal of the M2 gene of respiratory syncytial virus vaccine candidate cpts248/404 is the major determinant of the temperature-sensitive and attenuation phenotypes. *Virology* 247 (2), 232–239.
- Wu, T.D., Nacu, S., 2010. Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. *Bioinformatics* 26 (7), 873–881.
- Yoder, J.D., Trask, S.D., Vo, T.P., Binka, M., Feng, N., Harrison, S.C., Greenberg, H.B., Dormitzer, P.R., 2009. VP5\* rearranges when rotavirus uncoats. *Journal of Virology* 83 (21), 11372–11377.

## **Le contrôle de la traduction des ARN par la protéine NSP3 de rotavirus à l'épreuve d'un essai de traduction *in vivo*.**

La protéine de rotavirus NSP3 est impliquée dans l'inhibition de la traduction des ARNm cellulaires polyadénylés et dans la stimulation la traduction des ARNm viraux lors de l'infection par le rotavirus. Ces deux fonctions de NSP3 ont été établies principalement par des essais *in vitro* et ont été en partie contestées par des expériences utilisant des siRNA sur des cellules infectées. L'objectif de mon travail de thèse a été de mettre au point un essai de traduction *in vivo* permettant de quantifier l'effet de NSP3 sur la traduction des ARNm viraux et des ARNm cellulaires. Plus particulièrement, nous avons voulu évaluer la part de la circularisation des ARNm ("close loop" : modèle d'initiation de la traduction eucaryote) et de la simple protection de l'ARN sur l'expression des gènes viraux.

Des essais de transfection d'ARN rapporteurs polyadénylés en cellules infectées par le rotavirus m'ont permis de montrer que l'infection par le rotavirus inhibe bien la traduction des ARNm cellulaires mais que la force de cette inhibition est dépendante de la souche de rotavirus utilisée. Parallèlement, j'ai pu montrer que l'infection par le rotavirus stimule bien la traduction d'ARN rapporteurs se finissant par GACC (pseudoviraux) et que l'expression de NSP3 seule est suffisante pour obtenir cette stimulation. La surexpression de NSP3 sauvage ou mutée suivie d'électroporations d'ARN rapporteur pseudoviraux dans des cellules BSR m'ont permis de montrer qu'une petite quantité de NSP3 (difficilement détectables par immunodétection) est suffisante pour induire une bonne stimulation de la traduction. Une analyse par RT-qPCR a permis de montrer que la stabilisation de l'ARN seule ne rend pas compte de la totalité de la stimulation de la traduction des ARNm viraux obtenue avec la protéine NSP3 entière. Par contre, j'ai observé que l'expression de NSP3 (en dehors d'une infection) provoque une augmentation non spécifique de la traduction des ARN quelles que soient leurs extrémités 3'. Ainsi, le blocage de la traduction des ARNm cellulaires au cours de l'infection ne dépend pas uniquement de la protéine NSP3.

Enfin, la mise au point de ce système de traduction *in vivo* m'a permis de montrer que : 1/ seule l'extrémité 3' GACC permet une forte stimulation de la traduction par NSP3 ; 2/ mis à part des contraintes extrêmes (longueurs très courtes des parties non codantes (UTR)), la traduction dépendante de NSP3 s'effectue correctement quels que soient les UTR sur l'ARN.

Mots clés : rotavirus, NSP3, traduction, ARN

### **Control of RNA translation by protein NSP3 of rotavirus challenged by an *in vivo* translation assay.**

The rotavirus protein NSP3 is involved in the translation inhibition of polyadenylated cellular mRNAs and translation stimulation of viral mRNAs. These two functions of NSP3 have been established mainly by *in vitro* assays, then challenged by experiments using siRNA on cells infected. The objective of my thesis was to develop an *in vivo* translation assay to quantify the effect of NSP3 on the translation of viral and cellular mRNAs. More specifically, we wanted to assess the role of the circularization of mRNA ("closed loop" model of eukaryotic translation initiation) and the simple protection of the RNA on the expression of viral genes.

Transfections of polyadenylated reporters RNA in infected cells showed that rotavirus infection inhibits the translation of cellular mRNAs and that the strength of this inhibition depends on the rotavirus strain used. Meanwhile, I was able to show that rotavirus infection stimulates strongly the translation of reporter RNA with a 3' end GACC (viral-like) and that the expression of the sole NSP3 is sufficient for this stimulation. Overexpression of wild-type or mutated NSP3s followed by electroporation of viral-like reporter RNA in BSR cells showed that a small amount of NSP3 (hardly detectable by immunodetection) is sufficient to induce a good stimulation of translation. Moreover, quantification of transfected RNA by qRT-PCR showed that stabilization of the RNA does not only account for the totality of the stimulation of viral mRNA translation observed with NSP3wt. On the other hand, expression of NSP3 (without infection) causes a nonspecific increase of RNAs translation whatever their 3' ends. Thus, blocking the translation of cellular mRNAs during infection does not depends on the sole NSP3.

Finally, the use of the *in vivo* translation system allowed me to show that 1/ only a 3' end GACC induces a strong stimulation of translation by NSP3 ; 2/ except for extreme constraints (like very short lengths of noncoding regions), NSP3-dependent translation works fine regardless of the UTR sequence.

Keywords : rotavirus, NSP3, translation, RNA